

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE DE RECHERCHE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
STÉPHANIE PROULX, B.Sc. (Biologie médicale)

EXPRESSION DES SOUS-UNITÉS D'INTÉGRINES $\alpha 4$ ET $\alpha 5$
PAR L'ÉPITHÉLIUM PIGMENTAIRE RÉTINIEN

OCTOBRE 2004

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, en tout premier lieu, le Dr Christian Salesse qui a dirigé cette thèse dans la continuité de ma maîtrise. Tout au long de ces années, il a su me diriger tout en me laissant la liberté de gérer mon projet de recherche. Malgré son année sabbatique à Montpellier et son déménagement au Centre de Recherche du CHUL, il a toujours été disponible pour conseils et discussions. Pour tout cela, sa confiance, sa patience et son soutien financier à la maîtrise et en fin de thèse, je le remercie vivement.

Je voudrais également remercier le Dr Sylvain Guérin, qui en agissant à titre de co-directeur a fortement enrichi ma formation. Ses conseils et ses commentaires auront été fort utiles. Je remercie d'avance les autres membres du jury, Dr François Boucher, Dr Hélène-Marie Thérien et Dr Marie Audette, pour avoir accepté d'évaluer cette thèse avec grande rapidité.

Je tiens à remercier les assistants de recherche Marcelle Giasson et Steeve Leclerc, dont l'expertise a grandement aidé à la réalisation des travaux. Je remercie aussi les étudiant(e)s du laboratoire que j'ai côtoyé durant toutes ces années, pour les discussions enrichissantes et les bons moments passés en leur compagnie.

Je remercie ma famille pour leur support inconditionnel et omniprésent tout au long de mes études.

Les années consacrées à cette thèse n'auraient pas été les mêmes sans le support, l'intérêt et les encouragements de mon conjoint, Stéphane, à qui je porte des remerciements particuliers. Je dédie donc cette thèse à lui et à nos deux fils, qui ont aussi dû, à leur manière, faire des sacrifices pour la réalisation de cette thèse.

RÉSUMÉ

Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sont essentielles au bon fonctionnement des photorécepteurs de la rétine. De plus, elles participent au maintien de l'adhésion de la rétine au fond de l'œil. Les cellules de l'EPR sont quiescentes et différenciées dans la rétine normale, mais lors de différentes pathologies comme la vitréorétinopathie proliférante, les cellules se différencient, se détachent de la membrane de Bruch, migrent et prolifèrent dans le vitré et/ou sur la rétine. Il se forme alors des membranes dites épirétiennes et/ou vitréorétiennes qui se contractent et exercent une tension sur la rétine, menant au décollement de celle-ci. Il a été démontré que la fibronectine était une composante importante des membranes épirétiennes/vitréorétiennes. Ainsi, il a été proposé que les intégrines, une famille de protéines d'adhésion (et plus particulièrement les intégrines liant la fibronectine, comme les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$) sont impliquées dans la vitréorétinopathie proliférante. Sachant que les intégrines assurent la médiation plusieurs processus cellulaires comme la prolifération, la migration et la différenciation, l'expression de nouvelles intégrines ou l'augmentation/diminution de l'expression des intégrines déjà présentes sur l'EPR, pourrait faciliter la migration et la prolifération de l'EPR sur la rétine ou dans le vitré. Le principal objectif de cette thèse était donc d'étudier l'expression des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ sur les cellules de l'EPR en culture.

Nous avons premièrement déterminé les conditions expérimentales requises pour la réalisation de mes travaux de recherche. Nous avons donc débuté en développant une technique de dissection permettant la mise en culture de cellules de l'EPR humain sans contamination par d'autres types de cellules. Au cours de mes travaux à la maîtrise et au doctorat, j'ai disséqué des globes oculaires provenant d'environ 123 donneurs, âgés entre 6 jours et 65 ans (moyenne = 38 ans), dont 55% ont donné des cultures pures. Comme l'approvisionnement en yeux humains est variable, nous avons voulu déterminer

ensuite s'il était envisageable d'utiliser de l'EPR congelé. Ainsi, nous avons démontré que le passage et la cryopréservation des cellules de l'EPR entraînent une diminution de l'activité du promoteur $\alpha 5$ et de la quantité de protéine $\alpha 5\beta 1$. Il était donc évident qu'il fallait travailler uniquement avec des cellules fraîches qui n'avaient pas été cryopréservées. Pour la suite, en parallèle avec nos travaux où nous utilisons des cultures primaires d'EPR, nous voulions déterminer s'il était possible d'utiliser des cellules de l'EPR provenant de la lignée cellulaire ARPE-19 afin d'éliminer les problèmes reliés aux variations entre les donneurs. Nous avons donc vérifié si l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ par cette lignée au cours de leur progression vers l'état de quiescence cellulaire était similaire à celle observée avec les cultures primaires d'EPR. Bien que les niveaux de protéines et de transcrits obtenus avec les deux types de cellules soient similaires, nous avons noté d'importantes différences dans l'activité et la régulation du promoteur $\alpha 5$ entre les cellules en cultures primaires et la lignée cellulaire ARPE-19. Nous avons donc décidé de ne pas utiliser cette lignée pour nos études subséquentes. Nous avons ensuite démontré que la sous-unité $\alpha 5$ était exprimée à la surface de l'EPR *in situ*. À l'aide de cultures primaires de cellules de l'EPR humain, nous avons démontré que l'expression de la protéine et du transcrit, ainsi que l'activité du promoteur $\alpha 5$, diminuent lorsque les cellules de l'EPR deviennent quiescentes. Les résultats des transfections transitoires ont mis en évidence plusieurs régions d'activation et de répression du promoteur $\alpha 5$. Finalement, nous avons démontré que la sous-unité $\alpha 4$ était exprimée à la surface de l'EPR *in situ* et *in vitro*. Tout comme la sous-unité $\alpha 5$, la confluence entraîne également une diminution de la quantité de transcrit $\alpha 4$. De plus, les résultats de transfections transitoires ont permis d'identifier plusieurs régions d'activation et de répression dans le promoteur du gène $\alpha 4$.

Les résultats de cette thèse suggèrent que lors de la vitréorétinopathie proliférante, le promoteur du gène $\alpha 5$ serait régulé de façon positive, ce qui conduirait à une augmentation du transcrit $\alpha 5$ ainsi qu'à une augmentation de la

quantité de protéine $\alpha 5\beta 1$ à la surface des cellules de l'EPR. Ces résultats suggèrent donc que l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ devrait augmenter lors de la vitréorétinopathie proliférante, ce qui pourrait expliquer en partie le comportement aberrant qu'adoptent les cellules de l'EPR lors de cette pathologie. Puisque que la sous-unité $\alpha 4$ est rarement retrouvée dans les cellules autres que celles du système immunitaire et qu'elle lie un segment de la fibronectine qui est normalement uniquement exprimé durant la cicatrisation, l'expression de cette sous-unité par l'EPR est surprenante et suggère qu'elle pourrait être impliquée dans des processus pathologiques.

CONTRIBUTION DES AUTEURS DES ARTICLES PRÉSENTÉS DANS CETTE THÈSE

Puisque cette thèse est rédigée sous forme d'articles, il est de mise de mentionner la contribution de chacun des auteurs à la partie expérimentale et à la rédaction des articles.

Les chapitres 2 et 3 découlent de manipulations que j'ai entièrement planifiées et réalisées (test d'incorporation au bromodéoxy uridine, immunohistochimie, immunoprécipitation, RT-PCR semi-quantitatif, transfections transitoires). J'ai entièrement rédigé les manuscrits de ces chapitres qui ont ensuite été corrigés par les co-auteurs.

J'ai entièrement planifié les expériences, analysé et interprété les résultats du chapitre 4. J'ai réalisé 50% des mesures expérimentales (immunofluorescence, immunoprécipitation, RT-PCR semi-quantitatif, transfections transitoires). Solange Landreville a effectué la majorité des mesures de transfections transitoires et a répété les mesures d'immunoprécipitation et de RT-PCR semi-quantitatif. J'ai entièrement rédigé le manuscrit qui a ensuite été corrigé par les co-auteurs.

J'ai entièrement planifié les expériences, analysé et interprété les résultats du chapitre 5. J'ai réalisé 90% des mesures expérimentales (immunohistochimie, immunofluorescence, RT-PCR semi-quantitatif, transfections transitoires). Une partie des transfections transitoire a été effectué par Marcelle Giasson et Steeve Leclerc (assistants de recherche). J'ai rédigé 80% du manuscrit, la discussion ayant été rédigé de concert entre moi et les co-auteurs.



TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	ii
Résumé.....	iii
Contribution des auteurs des articles présentés dans cette thèse.....	vi
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xiv
Liste des symboles et des abréviations.....	xvi

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 L'œil.....	2
1.2 La rétine.....	3
1.2.1 Les cellules de Müller.....	4
1.2.2 Les cellules nerveuses.....	4
1.2.2.1 Les photorécepteurs.....	4
1.2.2.2 Les cellules bipolaires, horizontales et amacrines.....	5
1.2.2.3 Les cellules ganglionnaires et le nerf optique.....	5
1.2.3 Les cellules de l'EPR.....	6
1.2.4 Structure des cellules de l'EPR.....	6
1.2.4.1 La surface apicale des cellules de l'EPR.....	6
1.2.4.1.1 La mélanine.....	8
1.2.4.2 La surface latérale des cellules de l'EPR.....	8
1.2.4.3 La surface basale des cellules de l'EPR.....	9
1.2.4.3.1. La membrane de Bruch.....	9
1.2.5 Les fonctions des cellules de l'EPR.....	10
1.2.5.1 La phagocytose et la digestion des segments externes des photorécepteurs.....	10
1.2.5.1.1 La lipofuscine.....	11
1.2.5.2 La synthèse d'enzymes et de facteurs de croissance.....	12
1.2.5.3 L'échange d'ions et de métabolites.....	12

1.2.5.4	L'adhésion de la rétine au fond de l'œil.....	13
1.2.5.4.1	La matrice interphotoréceptrice.....	13
1.3	Les protéines d'adhésion.....	14
1.3.1	Les cadhérines.....	14
1.3.2	Les sélectines.....	15
1.3.3	Les molécules d'adhésion cellulaire des immunoglobulines.....	15
1.4	Les intégrines.....	16
1.4.1	Les différents types d'intégrines.....	17
1.4.1.1	Les intégrines $\beta 1$	17
1.4.1.2	Les intégrines $\beta 2$	17
1.4.1.3	Les intégrines $\beta 3$	19
1.4.1.4	Les intégrines $\beta 7$	19
1.4.1.5	Les autres intégrines β	19
1.4.2	Structure des intégrines.....	20
1.4.3	Mécanismes d'activation des intégrines.....	21
1.4.3.1	Rôle des cations divalents dans la liaison des intégrines à leur ligand.....	22
1.5	La fibronectine.....	24
1.5.1	Structure de la fibronectine.....	24
1.5.2	Le site de reconnaissance RGD.....	25
1.5.3	Présence de fibronectine dans la rétine.....	25
1.6	La vitréorétinopathie proliférante.....	26
1.7	L'intégrine $\alpha 4 \beta 1$	28
1.7.1	Interactions entre l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ et la fibronectine.....	28
1.7.2	Expression et rôle de l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$	28
1.7.3	Expression de l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ par les cellules de l'EPR.....	30
1.7.4	Le promoteur du gène $\alpha 4$	30
1.8	L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$	33
1.8.1	Interactions entre l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et la fibronectine.....	33
1.8.2	Expression et rôles de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$	33

1.8.3 Expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par les cellules de l'EPR.....	35
1.8.4 Promoteur du gène $\alpha 5$	35
1.9 Objectifs des travaux de recherche proposés.....	38
1.9.1 Objectifs du chapitre 2.....	38
1.9.2 Objectifs du chapitre 3.....	38
1.9.3 Objectifs du chapitre 4.....	39
1.9.4 Objectifs du chapitre 5.....	40

CHAPITRE 2 : LOSS OF INTEGRIN $\alpha 5$ SUBUNIT EXPRESSION AFTER CRYOPRESERVATION AND SEVERAL PASSAGES OF HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS

2.1 Résumé.....	44
2.2 Abstract.....	45
2.3 Introduction.....	46
2.4 Materials and methods.....	47
2.4.1 Cell cultures.....	47
2.4.2 Cryopreservation.....	47
2.4.3 Immunoprecipitation.....	48
2.4.4 Transient transfections and CAT assays.....	49
2.5 Results.....	50
2.5.1 Effect of cell passages.....	50
2.5.2 Effect of cryopréservation.....	50
2.6 Discussion.....	52
2.7 Acknowledgments.....	54
2.8 References.....	55
2.9 Figures.....	61

CHAPITRE 3 : EFFECT OF QUIESCENCE ON INTEGRIN $\alpha 5\beta 1$ EXPRESSION IN HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIUM

3.1 Résumé.....	66
3.2 Abstract.....	67

3.3 Introduction.....	68
3.4 Methods.....	70
3.4.1 Cell cultures.....	70
3.4.2 Bromo-deoxyuridine labelling.....	71
3.4.3 Immunohistochemistry.....	71
3.4.4 Immunoprecipitation.....	72
3.4.5 Semi-quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	73
3.4.6 Transient transfections and CAT assays.....	74
3.5 Results.....	75
3.5.1 The $\alpha 5$ integrin subunit is expressed on RPE cells in situ.....	75
3.5.2 Proliferating and quiescent RPE cells in vitro.....	76
3.5.3 Decrease of the $\alpha 5$ protein at the RPE cell surface with cellular quiescence.....	76
3.5.4 Transcription of the $\alpha 5$ gene varies with increasing cell confluence.....	77
3.6 Discussion.....	79
3.7 Acknowledgements.....	83
3.8 References.....	83
3.9 Figures.....	91

**CHAPITRE 4 : INTEGRIN $\alpha 5$ EXPRESSION IN THE ARPE-19 CELL LINE:
COMPARISON WITH PRIMARY RPE CULTURES AND
EFFECT OF GROWTH MEDIUM ON THE $\alpha 5$ GENE
PROMOTER STRENGTH**

4.1 Résumé.....	98
4.2 Abstract.....	100
4.3 Introduction.....	101
4.4 Materials and methods.....	103
4.4.1 Cell culture.....	103
4.4.2 Immunofluorescence.....	103

4.4.3 Immunoprecipitation.....	104
4.4.4 Semi-quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	105
4.4.5 Transient transfections.....	106
4.5 Results.....	106
4.6 Discussion.....	108
4.7 Acknowledgements.....	111
4.8 References.....	111
4.9 Figures.....	120

CHAPITRE 5: INTEGRIN SUBUNIT $\alpha 4$ EXPRESSION ON HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS

5.1 Résumé.....	126
5.2 Abstract.....	126
5.3 Integrin subunit $\alpha 4$ expression on human retinal pigment epithelial cells	127
5.4 Acknowledgements.....	131
5.5 References.....	132
5.6 Figures.....	136

CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

6.1 Chapitre 2 : Influence du passage et de la cryopréservation sur l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ par les cellules de l'EPR.....	139
6.1.1 Récapitulation des résultats et discussion.....	139
6.1.2 Perspectives de recherche.....	141
6.1.3 Rapport de l'intensité des bandes.....	142
6.2 Chapitres 3 et 4 : Expression de la sous-unité $\alpha 5$ par les cellules de l'EPR.....	143
6.2.1 Récapitulation des résultats et discussion.....	143
6.2.1.1 Évaluation de la quiescence des cellules en culture..	143

6.2.1.2	Expression protéique de la sous-unité $\alpha 5$	144
6.2.1.3	Expression du gène $\alpha 5$	146
6.2.1.4	Régulation du promoteur $\alpha 5$ des cultures primaires des cellules de l'EPR.....	146
6.2.1.5	Régulation de l'activité du promoteur $\alpha 5$ des cellules de la lignée ARPE-19 et comparaison avec les résultats obtenus avec les cultures primaires.....	148
6.2.2	Perspectives de recherche.....	151
6.2.2.1	Régulation de l'activité du promoteur $\alpha 5$	151
6.2.2.2	Influence du vitré.....	152
6.2.2.3	Influence de la fibronectine.....	154
6.3	Chapitre 5 : Expression de la sous-unité $\alpha 4$ par les cellules de l'EPR.....	154
6.3.1	Récapitulation des résultats et discussion.....	154
6.3.2	Perspectives de recherche.....	157
CHAPITRE 7: BIBLIOGRAPHIE.....		159

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Les intégrines et leur(s) ligand(s).....	18
-------------	--	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Schéma de l'œil.....	2
Figure 1.2	Schéma de la rétine.....	3
Figure 1.3	Schéma d'un bâtonnet.....	5
Figure 1.4	Schéma de l'EPR et de la membrane de Bruch.....	7
Figure 1.5	Schéma d'une intégrine.....	20
Figure 1.6	Structure de l'intégrine $\alpha v \beta 3$	23
Figure 1.7	Structure d'un monomère de la fibronectine.....	24
Figure 1.8	Séquence du promoteur du gène $\alpha 4$	32
Figure 1.9	Séquence du promoteur du gène $\alpha 5$	37
Figure 2.1	Effect of RPE cell passage on the activity directed by the $\alpha 5$ integrin gene promoter.....	61
Figure 2.2	Effect of cryopreservation on the activity directed by the $\alpha 5$ integrin gene promoter.....	62
Figure 2.3	Effect of cryopreservation on the amount of integrin $\alpha 5$ at the RPE cell surface.....	63
Figure 3.1	Immunofluorescent detection of integrin $\alpha 5$ in situ.....	91
Figure 3.2	Proliferation assay.....	92
Figure 3.3	Immunoprecipitation of biotinylated cell surface proteins with anti integrin $\alpha 5$ antibody.....	93
Figure 3.4	RT-PCR amplification of integrin $\alpha 5$ mRNAs.....	94
Figure 3.5	Cell density dependence of the $\alpha 5$ promoter activity in RPE cells.....	95
Figure 4.1	Immunofluorescence detection of integrin $\alpha 5$ on RPE cells	120
Figure 4.2	Effect of confluency on cell surface protein levels and mRNA levels.....	121
Figure 4.3	Integrin $\alpha 5$ promoter activity in primary cultures of RPE cells and ARPE-19.....	122

Figure 5.1	Immunofluorescence analysis of the $\alpha 4$ integrin subunit on cryosections of a human retina (A,B) and on cultured human RPE cells (C,D).....	136
Figure 5.2	Expression of $\alpha 4$ transcripts and $\alpha 4$ promoter activity in cultured human RPE cells.....	137
Figure 6.1	Immunoprécipitation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$	143
Figure 6.2	Détection par immunofluorescence de la sous-unité $\alpha 5$ des cellules de l'EPR confluentes par microscopie confocale.....	145
Figure 6.3	Activité du promoteur $\alpha 5$ des cellules de l'EPR confluentes.....	147
Figure 6.4	Transfections transitoires effectuées sur les cellules de la lignée ARPE-19 confluentes cultivées dans du milieu DMEM/F12 (noir) et du milieu Kératinocyte-SFM (gris).....	151
Figure 6.5	Effet du vitré sur l'activité du promoteur $\alpha 5$	153
Figure 6.6	Activité du promoteur $\alpha 4$ des cellules de l'EPR non-confluentes.....	156

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS

IIICS	« Type III Connecting Segment », segment de connection de type III
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de variance
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
bp	« base pair », paire de bases
bFGF	« basic fibroblast growth factor », facteur de croissance fibroblastique de base
BrdU	bromo-deoxy-uridine
BSA	« bovine serum albumin », albumine de sérum bovin
C	confluent
C3bi	C3b inactivé (composante du complément)
CAM	« cell adhesion molecule », molécule d'adhésion cellulaire
CAT	chloramphenicol acétyl transférase
CHO	« chinese hamster ovary », cellules d'ovaires de hamster chinois
CRALBP	« cellular retinaldehyde binding protein »
DNA	Acide désoxyribonucléique
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECM	« Extracellular matrix », matrice extracellulaire
EDA	« Extra Domain A », domaine supplémentaire A
EDB	« Extra Domain B », domaine supplémentaire B
EDGIHEL	acide glutamique – acide aspartique – glycine – isoleucine – histidine – acide glutamique – leucine
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
FGF-5	« fibroblast growth factor-5 », facteur de croissance fibroblastique-5
HLA	« human leukocyte antigen »
FN	fibronectine
HGFR	« hepatocyte growth factor receptor », récepteur du facteur de croissance de l'hépatocyte

hGH	« human growth hormone », hormone de croissance humaine
HT-29	cellules de carcinome du colon humain
HUVEC	« human umbilical vein endothelial cells », cellules endothéliales de cordon ombilical humain
ICAM	« intercellular cell adhesion molecule », molécule d'adhésion intercellulaire
IDAPS	isoleucine – acide aspartique – alanine – proline – serine
Ig-CAM	« immunoglobulin-cell adhesion molecule », molécule d'adhésion cellulaire des immunoglobulines
IGFBP-2	« insulin growth factor binding protein-2 », protéine de liaison au facteur de croissance de l'insuline-2
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
KLDAPT	lysine – leucine – acide aspartique – alanine – proline – thréonine
LDV	leucine – acide aspartique – valine
MadCAM	« mucosal adressin cell adhesion molecule »
MCS	« multicloning site », site de multiclونage
MCT	« monocarboxylate transporters », transporteurs de monocarboxylate
mRNA	Acide ribonucléique messenger
MRP1	« multidrug resistance-associated protein 1 », protéine associée à la multirésistance aux drogues
pb	paire de bases
PC	post-confluent
PHSRN	proline – histidine – sérine – arginine – asparagine
PVR	« proliferative vitreoretinopathy », vitreorétinopathie proliférante
PVP	polyvinylpyrrolidone
RCEC	« rabbit corneal epithelial cells », cellules épithéliales de cornée de lapin
REDV	arginine – acide glutamique – acide aspartique – valine
RIE1	cellules épithéliales de l'intestin de rat
RGD	arginine – glycine – acide aspartique

RNA	Acide ribonucléique
RPE	Épithélium pigmentaire rétinien
RT	« room temperature », température pièce
RT-PCR	« Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction », transcription inverse suivi d'une réaction de polymérase en chaîne
SC	« sub-confluent », non-confluent
SFM	« serum-free medium », milieu sans sérum
TNF	« tumor necrosis factor », facteur de nécrose de tumeur
TRITC	Tetra rhodamine isothiocyanate
VCAM-1	« vascular cell adhesion molecule-1 », molécule d'adhésion vasculaire-1
VLA-4	« Very Late Antigen-4 », antigène très tardif 4
VLA-5	« Very Late Antigen-5 », antigène très tardif 5

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 L'ŒIL

L'œil est formé de trois enveloppes (de l'extérieur vers l'intérieur) : la sclère (ou sclérotique), la choroïde et la rétine (Figure 1.1) (1). La sclère, qui est cartilagineuse, devient transparente à la partie antérieure de l'œil pour former la cornée. La choroïde se prolonge par les corps ciliaires et l'iris, qui limite la pupille, derrière laquelle se trouve une lentille biconvexe, le cristallin. La rétine, seule membrane sensible aux rayons lumineux, contient les cellules visuelles, les cônes et les bâtonnets, ainsi qu'une couche de cellules épithéliales, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), cellules dont il sera question dans cette thèse.

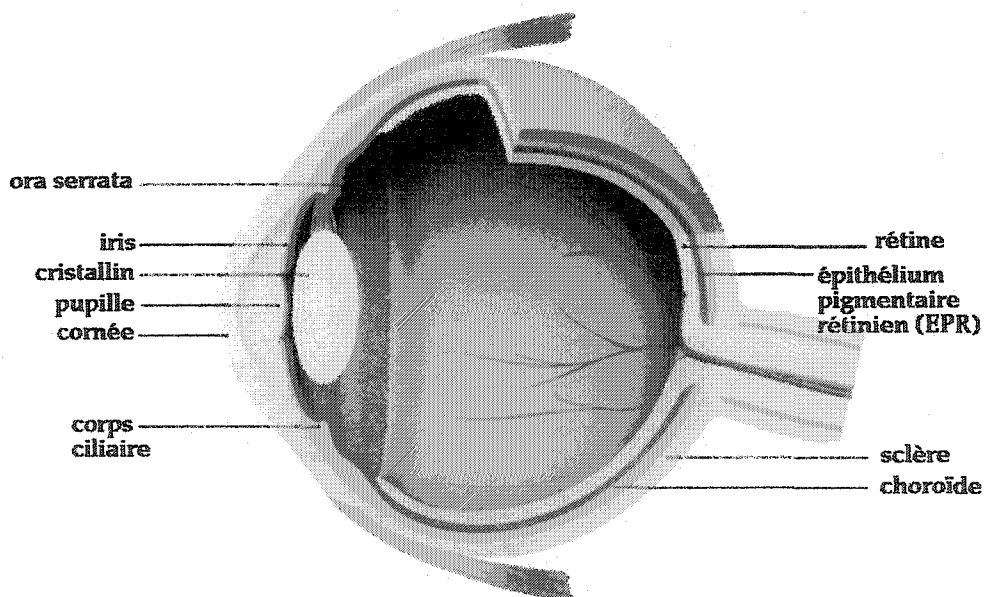


FIGURE 1.1 : Schéma de l'œil. Tiré de (1).

Le contenu de l'œil est constitué par l'humeur aqueuse qui nourrit la cornée et par le vitré (ou corps vitré), un gel transparent qui remplit le globe oculaire entre le cristallin et la rétine, et qui assure le maintien du volume de l'œil (2).

1.2 LA RÉTINE

La rétine transforme la lumière en signal nerveux. Elle nous permet de voir dans des conditions très variables, en plein soleil comme à la lueur des étoiles, et de distinguer les longueurs d'onde du rayonnement visible, c'est à dire les couleurs des objets (3).

La rétine est une membrane mince et transparente (Figure 1.2) dont la face postérieure est en contact avec la choroïde et la face antérieure avec le corps vitré. Elle est composée de cellules de soutien rétiniennes (cellules de Müller) (section 1.2.1), de différents types de cellules nerveuses (section 1.2.2), incluant les photorécepteurs (cônes et bâtonnets), ainsi que de cellules de l'EPR (section 1.2.3) (1).

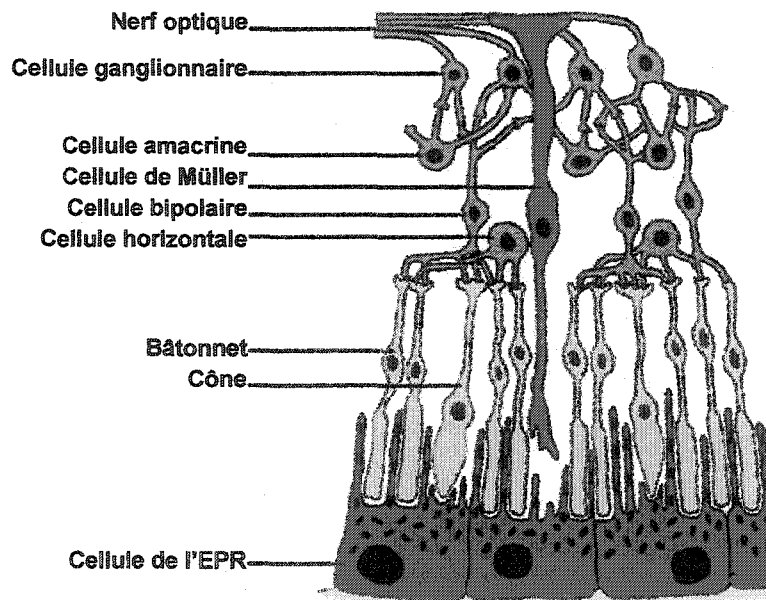


FIGURE 1.2 : Schéma de la rétine. Image modifiée de (4).

1.2.1 Les cellules de Müller

Les cellules de Müller (Figure 1.2) sont des cellules gliales qui agissent comme structure de support. Elles sont en contact physique avec tous les autres types de cellules nerveuses de la rétine et peuvent moduler l'activité neurale, surtout en contrôlant la concentration d'ions extracellulaires et en recyclant les neurotransmetteurs en excès (5). Les cellules de Müller jouent aussi un rôle critique dans le maintien des cellules photoréceptrices, puisqu'il a été démontré que de stresser expérimentalement ou d'éliminer les cellules de Müller entraîne la mort des photorécepteurs (6-8).

1.2.2 Les cellules nerveuses

1.2.2.1 Les photorécepteurs

Il existe deux types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets (Figure 1.2). Les cônes sont sensibles à la qualité du rayonnement lumineux et sont responsables de l'acuité visuelle et de la vision des couleurs. Ils sont majoritaires au centre de la rétine dans une région nommée macula, et sont seuls présents dans la fovéa, le centre de la macula (2). Les bâtonnets sont responsables de la vision dans des conditions de faible éclairage. Ils sont distribués sur l'ensemble de la rétine et permettent l'élargissement du champ visuel, ou vision périphérique (2).

Les photorécepteurs sont composés d'un segment externe, d'un segment interne et d'une terminaison synaptique (Figure 1.3) (9). Le segment externe est formé d'un empilement de disques membranaires qui sont composés de 50% de phospholipides et de 50% de protéines (9). Les phospholipides qui constituent les membranes des disques des segments externes des photorécepteurs sont principalement composés d'acides gras polyinsaturés (10). Le segment interne comprend le noyau, les organites cellulaires de même que toute la machinerie métabolique (9). La terminaison synaptique sert à

transmettre, par le biais de neurotransmetteurs, le signal électrique provenant de la phototransduction (9).

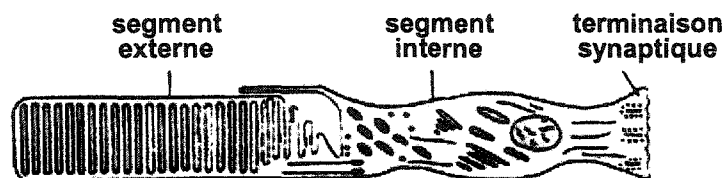


Figure 1.3 : Schéma d'un bâtonnet. Image tirée de (11).

1.2.2.2 Les cellules bipolaires, horizontales et amacrines

Entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires (Figure 1.2), il existe une couche de cellules intermédiaires, qui contient trois types de cellules nerveuses : les cellules bipolaires, horizontales et amacrines (3). Les cellules bipolaires reçoivent les informations des photorécepteurs et elles projettent souvent un axone vers les cellules ganglionnaires (3). Les cellules horizontales relient les photorécepteurs aux cellules bipolaires par des connexions relativement longues, qui sont parallèles au plan des couches de cellules rétinienne (3). De même, les cellules amacrines relient les cellules bipolaires aux cellules ganglionnaires (3).

1.2.2.3 Les cellules ganglionnaires et le nerf optique

Les cellules ganglionnaires se prolongent par les fibres nerveuses qui se réunissent en une région appelée papille pour former le nerf optique. Le nerf optique transmet ensuite au cerveau les informations visuelles de la rétine (2).

1.2.3 Les cellules de l'EPR

Les cellules de l'EPR font face aux photorécepteurs (Figure 1.2). Histologiquement, les cellules de l'EPR forment une monocouche de cellules épithéliales pigmentées et fermement entassées (Figure 1.4) (12). Chez l'humain adulte, le nombre de cellules varie de 4.2 à 6.1 millions (12). Au centre de l'œil, ces cellules sont petites (environ 10-14 μm de diamètre), mais elles s'aplatissent et s'élargissent (jusqu'à un diamètre d'environ 60 μm) près de la périphérie. Puisque que la densité des photorécepteurs varie aussi d'un côté à l'autre de la rétine, le nombre de photorécepteurs recouvrant chaque cellule de l'EPR demeure relativement constant, ce nombre étant d'environ 45 photorécepteurs par cellule (12). Les cellules de l'EPR sont polarisées, c'est à dire qu'elles ont un côté apical et un côté basal distincts (13), dont la description suivra dans la section suivante.

1.2.4 Structure des cellules de l'EPR

1.2.4.1 La surface apicale des cellules de l'EPR

La membrane plasmique apicale (faisant face aux photorécepteurs) des cellules de l'EPR élabore des microvillis de différentes longueurs (Figure 1.4 (A)), qui servent 1) à la phagocytose des segments externes des cônes et des bâtonnets, et 2) à faciliter l'échange de nutriments entre ces deux types de cellules, étant donné la proximité et la grande surface entre les membranes plasmiques des photorécepteurs et des cellules de l'EPR (14). La membrane plasmique apicale de l'EPR contient aussi de nombreuses pompes et échangeurs d'ions (voir section 1.2.5.3). La membrane plasmique des photorécepteurs et celle des cellules de l'EPR n'ont aucun point de contact et sont séparées par une très fine couche de matrice extracellulaire, appelé matrice interphotoréceptrice (voir section 1.2.5.4.1).

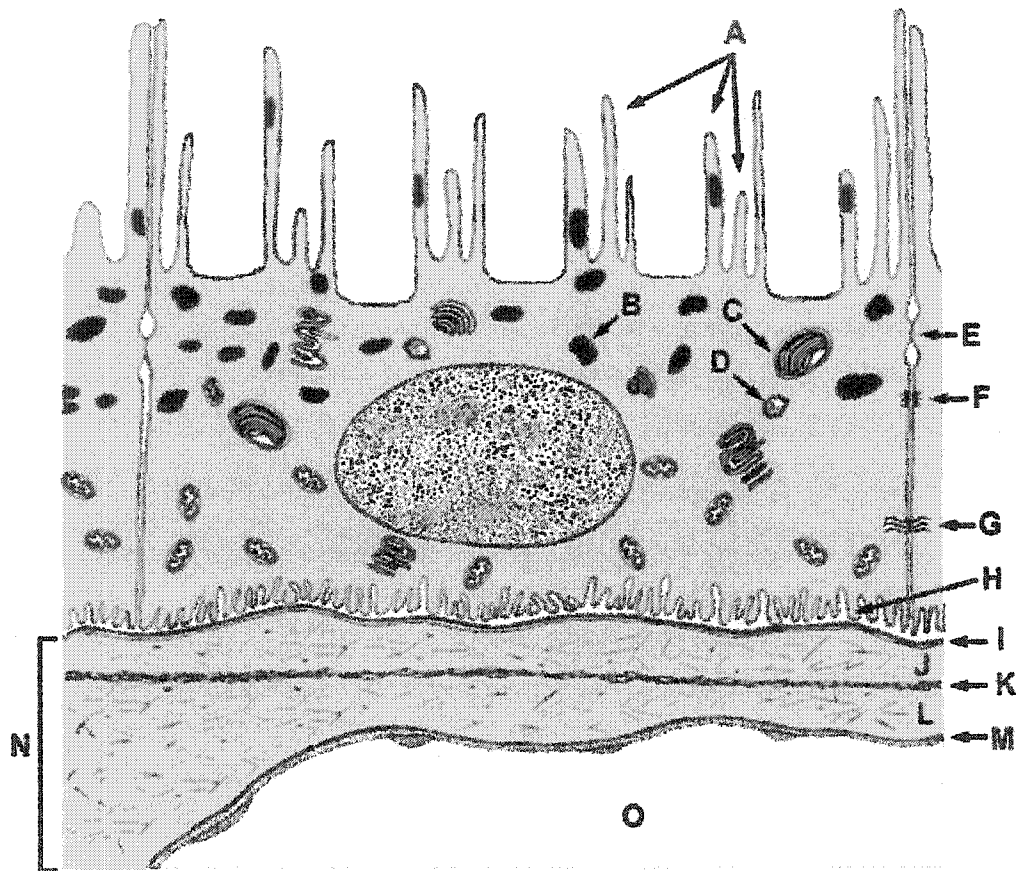


FIGURE 1.4 : Schéma de l'EPR et de la membrane de Bruch. A) Microvillosités de la membrane plasmique apicale, B) Granule de mélanine, C) Phagosome, D) Lysosome, E) Jonction étanche, F) Jonction adhérente, G) Desmosome, H) Repliements de la membrane plasmique basale, I) Membrane basale de l'EPR, J) Couche collagèneuse interne, K) Couche d'élastine, L) Couche collagèneuse externe, M) Membrane basale d'un capillaire de la choroïde, N) Membrane de Bruch, O) Capillaire de la choroïde. Image modifiée de (15).

Le cytoplasme du côté apical contient des microfilaments et des microtubules; c'est aussi dans cette région que l'on retrouve la plus grande concentration de granules de mélanine (Figure 1.4 (B)) (13).

1.2.4.1.1 La mélanine

L'EPR tient son nom des pigments de mélanine qui sont présents à l'intérieur de granules cytoplasmiques appelés mélanosomes. L'EPR est le premier tissu de l'organisme à devenir pigmenté, et la mélanogenèse se poursuit à un certain degré tout au long de la vie. Cependant, en vieillissant, ces granules se fusionnent avec les lysosomes (Figure 1.4 (D)) et se décomposent, l'EPR des personnes âgées apparaissant typiquement moins pigmenté. La mélanine absorbe l'excès de lumière et minimise la dispersion de celle-ci à l'intérieur de l'œil. Elle sert aussi comme stabilisateur de radicaux libres (12,16).

La mélanine peut également lier plusieurs drogues, produits chimiques et métaux, comme le magnésium, le calcium, le zinc, le cuivre et le fer (12) (16,17). La mélanine pourrait donc jouer un rôle de protection en liant des produits toxiques provenant des capillaires de la choroïde (18). Par contre, ce mécanisme de protection peut être nuisible pour l'EPR et contribuer à une toxicité cellulaire. Il a été démontré que les drogues comme la chlorpromazine et la chloroquine se lient de façon irréversible à la mélanine (19). Une exposition chronique à ces substances résulte en des lésions aux cellules pigmentées ou aux cellules adjacentes (photorécepteurs) (19-22).

1.2.4.2 La surface latérale des cellules de l'EPR

Comme les autres cellules épithéliales polarisées, chaque cellule de l'EPR est liée à ses cellules voisines par des jonctions cellulaires composées de jonctions étanches (zonulae occludens) (Figure 1.4 (E)) (23,24), de jonctions adhérentes (zonulae adherens) (Figure 1.4 (F)) (14) et de desmosomes (Figure 1.4 (G)) (25,26). Les jonctions étanches sont situées près de la région apicale

de la membrane plasmique et préviennent la diffusion de macromolécules à travers l'espace entre les cellules adjacentes de l'EPR. Ces jonctions étanches représentent la principale structure responsable de la barrière sang-oculaire (12,15,27). Les jonctions adhérentes, une région enrichie en filaments d'actine chez toutes les cellules épithéliales, sont particulièrement développées dans les cellules de l'EPR (14,28). Les filaments d'actine procurent une force mécanique aux liaisons intercellulaires. Comparativement aux autres cellules épithéliales, les desmosomes de l'EPR y sont présents de façon beaucoup moins importante (29).

1.2.4.3 La surface basale des cellules de l'EPR

La membrane plasmique basale des cellules de l'EPR contient plusieurs repliements (Figure 1.4 (H)). Comme pour la surface apicale, ces repliements augmentent la surface de cette membrane et facilitent l'échange de nutriments entre les cellules de l'EPR et les capillaires de la choroïde (Figure 1.4 (O)) (12). La membrane plasmique basale contient aussi plusieurs transporteurs d'ions qui sont décrits à la section 1.2.5.3. Le noyau, les mitochondries et les microperoxisomes sont préférentiellement localisés dans le cytoplasme du côté basal (13). Du côté basal, les cellules de l'EPR sont séparées de la choroïde par un flasque réseau de fibres de collagène (et autres protéines de structure) appelé membrane de Bruch (Figure 1.4 (N)) (12).

1.2.4.3.1 La membrane de Bruch

La membrane de Bruch (Figure 1.4 (N)) est composée de cinq couches, soit la membrane basale des cellules de l'EPR (Figure 1.4 (I)), une couche appelée « collagèneuse interne » (Figure 1.4 (J)), une couche appelée « élastine » (Figure 1.4 (K)), une couche appelée « collagèneuse externe » (Figure 1.4 (L)) et, finalement, la membrane basale des capillaires de la choroïde (Figure 1.4 (M)) (30). Plusieurs éléments de la matrice extracellulaire ont été identifiés dans la membrane de Bruch (30). La membrane basale de

l'EPR est surtout composée de collagène de type IV et V, de laminine et d'héparine sulfate. Les couches « collagèneuse interne » et « collagèneuse externe » sont composées de collagène de type I, III et V, de fibronectine, de chondroïtine sulfate et de dermatan sulfate. La couche « élastine », comme son nom l'indique, est composée d'élastine ainsi que de collagène de type VI et de fibronectine. La membrane basale des capillaires de la choroïde est composée de collagène de type IV, V et VI, de laminine et d'héparine sulfate. La membrane de Bruch a non seulement un rôle de soutien, mais aussi d'adhésion aux cellules de l'EPR. En effet, des protéines d'adhésion situées à la surface des cellules de l'EPR, nommées intégrines, assurent la liaison entre la membrane cellulaire de l'EPR et la membrane de Bruch.

1.2.5 Les fonctions des cellules de l'EPR

L'EPR est l'une des plus importantes couches cellulaires dans le système visuel et s'avère vital à l'intégrité des cônes et des bâtonnets de la rétine. Ces cellules participent à plusieurs fonctions complexes comme la phagocytose et la digestion des segments externes des photorécepteurs (section 1.2.5.1), la synthèse d'enzymes et de facteurs de croissance (section 1.2.5.2), l'échange d'ions et de métabolites (section 1.2.5.3), l'adhésion de la rétine (section 1.2.5.4) et l'absorption de l'excès de lumière (comme décrit précédemment à la section 1.2.4.1.1). Elles représentent la principale structure responsable de la barrière sang-oculaire (comme décrit précédemment à la section 1.2.4.2).

1.2.5.1 La phagocytose et la digestion des segments externes des photorécepteurs

Tout comme la peau, les photorécepteurs sont continuellement exposés à la lumière et à l'oxygène (via la choroïde), ce qui facilite la production de radicaux libres et qui, avec le temps, peut endommager leur membrane (31). Les segments externes des photorécepteurs ne pourraient subsister toute une vie sans renouvellement. À tous les jours, jusqu'à 100 disques par

photorécepteur sont phagocytés, alors que de nouveaux disques sont synthétisés par les segments internes des photorécepteurs (32). Ce processus de phagocytose suit, à un certain degré, un rythme circadien, la phagocytose des bâtonnets étant plus importante le matin à l'arrivée de la lumière alors que la phagocytose des cônes est plus importante le soir, à l'approche de la noirceur (33). Le matériel phagocyté devient encapsulé dans des vésicules appelées phagosomes (Figure 1.4 (C)), qui se fusionnent ensuite avec des lysosomes (Figure 1.4 (D)) pour faciliter leur digestion (32-35). Cette étape constitue une tâche métabolique considérable pour l'EPR, puisque chaque cellule doit ingérer et digérer plus de 4000 disques par jour. Normalement, les acides gras polyinsaturés sont recyclés et les déchets évacués par l'EPR, mais un peu de ce matériel membranaire pourrait persister dans l'EPR et ces corps résiduels pourraient contribuer à la formation de la lipofuscine (33).

1.2.5.1.1 La lipofuscine

La lipofuscine de l'EPR semble être dérivée de la digestion incomplète des lipides des segments externes des photorécepteurs. La lipofuscine représente possiblement des fragments membranaires qui ont été endommagés par la lumière ou l'oxydation et qui sont donc moins digestibles et moins bien dégradés. Dix fractions fluorescentes différentes ont été identifiées dans des extractions de lipofuscine des cellules de l'EPR (36-38). La lipofuscine émet dans un large spectre de la région visible. Par exemple, lorsqu'excitée à 488 nm, la lipofuscine émet de la fluorescence entre 500 et 650 nm; lorsqu'excitée à 568 nm, elle émet entre 520 et 700 nm, et lorsqu'excitée à 633 nm, elle émet entre 650 et 720 nm (39). La lipofuscine s'accumule graduellement avec l'âge. Elle peut déjà être détectée chez l'enfant et l'EPR des personnes âgées contient une importante quantité de ce pigment autofluorescent (40).

1.2.5.2 La synthèse d'enzymes et de facteurs de croissance

L'EPR synthétise des enzymes qui sont utilisées à plusieurs fonctions, comme le transport membranaire, le métabolisme du pigment visuel (41) et la digestion de déchets (33). L'EPR synthétise aussi des hormones et des facteurs de croissance qui aident à répondre et/ou à réguler l'environnement de l'EPR et des photorécepteurs (42). Plusieurs de ces fonctions sont assumées par la membrane de ce type de cellule qui contient une grande variété de récepteurs et de canaux pour les ions et les métabolites.

1.2.5.3 L'échange d'ions et de métabolites

L'EPR contrôle le volume et la composition du fluide de l'espace sous-rétinien¹ par un transport d'ions et de métabolites (43-49). L'EPR, comme toutes les cellules épithéliales, a la propriété de transporter les métabolites, les fluides et les ions de façon vectorielle, soit, dans ce cas-ci, de la direction de la rétine vers la choroïde ou de la choroïde vers la rétine. Plusieurs transporteurs d'ions ont été identifiés dans l'EPR bovin (49). Sur sa face apicale, l'EPR possède des pompes Na^+/K^+ -ATPase, des canaux K^+ , des co-transporteurs $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, des co-transporteurs H^+ -lactate, des co-transporteurs NaHCO_3 , des co-transporteurs Na^+ -anion, et des échangeurs Na^+/H^+ . Sur sa face basale, l'EPR possède des canaux Na^+ , des canaux Cl^- et K^+ , des échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, des co-transporteurs NaHCO_3 et des co-transporteurs Na^+ -lactate. La distribution apicale/basale de ces transporteurs est clairement asymétrique, et c'est cette différence qui permet à l'EPR d'exécuter le transport vectoriel (49).

L'EPR régule et/ou transporte aussi des métabolites et des nutriments comme la taurine, le GABA, le glucose, l'acide ascorbique et des acides aminés (49). Par exemple, l'EPR transporte la taurine, protéine essentielle pour les photorécepteurs, et transporte sélectivement le D-glucose mais pas le L-

¹ Espace sous-rétinien: espace extracellulaire délimité par la membrane apicale des cellules de l'EPR, la portion distale des cellules de Müller et des segments externes des photorécepteurs.

glucose (12). Des récepteurs membranaires spécialisés lient des métabolites nécessaires, comme la vitamine A, ainsi que plusieurs hormones comme l'épinéphrine et la dopamine.

1.2.5.4 L'adhésion de la rétine au fond de l'œil

L'EPR est impliqué de façon importante dans le maintien de l'adhésion de la rétine au fond de l'œil (et donc dans la résistance au détachement de celle-ci). L'adhésion de la rétine est un processus complexe qui implique plusieurs mécanismes complémentaires et interactifs (50). Il existe des systèmes passifs, comme la pression intraoculaire du vitré et la pression osmotique de la choroïde, qui aident à maintenir la rétine en place. De très fortes évidences suggèrent que l'activité métabolique de l'EPR pourrait contribuer au maintien de cette adhésion. La base probable de ces effets métaboliques est le transport de l'eau à travers l'EPR, ce qui contrôle l'hydratation et l'environnement local de l'espace sous-rétinien. Le médiateur de cet effet, et aussi un élément critique de l'adhésion rétinienne, est la matrice interphotoréceptrice.

1.2.5.4.1 La matrice interphotoréceptrice

La matrice interphotoréceptrice est un matériel hautement structuré composé de molécules diffusibles qui sont distribuées à l'intérieur d'un réseau relativement insoluble de protéoglycanes et de conjugués glycosylés qui entourent les cônes et les bâtonnets (51). La matrice lie fermement la membrane limitante externe des photorécepteurs à la membrane apicale de l'EPR. Les propriétés d'adhésion et la viscosité de la matrice interphotoréceptrice dépendent de son hydratation et de son environnement ionique qui sont contrôlés métaboliquement par l'EPR. Cette matrice sert aussi de voie de cheminement pour les nutriments et autres substances qui traversent l'espace sous-rétinien. Elle semble être une région importante pour la production de récepteurs et de protéines d'adhésion qui contribuent au bon maintien de l'environnement des photorécepteurs.

1.3 LES PROTÉINES D'ADHÉSION

Les cellules adhèrent à d'autres cellules ou à la matrice extracellulaire par l'entremise de protéines adhésion. Il existe quatre grandes familles de protéines d'adhésion, soit les cadhérines, les sélectines, les molécules d'adhésion cellulaire des immunoglobulines et les intégrines.

1.3.1 Les cadhérines

Les cadhérines constituent une famille de glycoprotéines transmembranaires qui partagent un domaine extracellulaire composé de répétitions d'un motif spécifique aux cadhérines (52). Les membres de cette famille interviennent dans les interactions cellulaires homotypiques via la liaison de leurs homologues exprimés à la surface des cellules adjacentes. Les cadhérines sont des molécules qui dépendent du calcium pour être fonctionnellement actives (52).

La sous-famille des cadhérines appelée « classique » comprend les cadhérines de type N-, P-, R-, B- et E-, ainsi qu'une dizaine d'autres membres (53). Ces cadhérines sont retrouvées dans les jonctions adhérentes où elles établissent des contacts avec les filaments d'actine. L'autre sous-famille importante des cadhérines est constituée principalement de desmocolline et de desmoglérine. Ces cadhérines sont associées aux desmosomes pour former des liaisons avec les filaments intermédiaires (54).

Pour la plupart des cellules épithéliales, la protéine E-cadhérine agit comme morphogène épithélial, c'est à dire qu'elle induit le développement d'un phénotype épithélial *in vitro* suite au contact des cellules à confluence (14,55,56). La protéine E-cadhérine semble être un morphogène épithélial plus puissant que les autres membres de cette famille (57-59). Les cellules de l'EPR n'expriment pas la protéine E-cadhérine mais expriment plutôt une cadhérine qui est normalement retrouvée sur les cellules non-épithéliales, la N-cadhérine

(60,61). Ceci pourrait expliquer pourquoi les cellules de l'EPR prennent plus de temps (comparativement aux cellules épithéliales exprimant E-cadhérine) à développer leur phénotype épithélial *in vitro* (62).

1.3.2 Les sélectines

Les sélectines sont une petite famille de protéines d'adhésion composée de 3 membres, les sélectines de type L-, P- et E- (63-65). Les sélectines sont impliquées dans les interactions hétérotypiques cellule-cellule et dépendent du calcium pour être fonctionnellement actives. La protéine L-sélectine est exprimée de façon constitutive sur les leucocytes. La protéine P-sélectine est présente sous une forme latente dans les cellules endothéliales et les plaquettes. La protéine E-sélectine est synthétisée et exprimée sur les cellules endothéliales en réponse à des cytokines comme le facteur de nécrose de tumeur (TNF pour « tumor necrosis factor ») ou l'interleukine-1 (IL-1) (63-65). La protéine E-sélectine a été identifiée sur les cellules de l'EPR suite à une photocoagulation de la rétine (66-68).

Les rôles des sélectines sont moins bien connus que ceux des autres protéines d'adhésion. Cependant, il devient de plus en plus clair que les sélectines jouent un rôle important, avec l'aide des intégrines, dans la récupération des leucocytes de la circulation sanguine par les parois vasculaire endothéliales (69).

1.3.3 Les molécules d'adhésion cellulaire des immunoglobulines

Les molécules d'adhésion cellulaire des immunoglobulines (Ig-CAMs pour « immunoglobulin-cell adhesion molecules ») constituent une grande famille de protéines d'adhésion. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires qui se distinguent par la présence d'un ou plusieurs repliement(s) appelé(s) « Ig » (70).

Les membres de cette famille sont présents sur une grande variété de type cellulaires et jouent des rôles dans plusieurs processus cellulaires différents. Les Ig-CAMs jouent un rôle important dans le système nerveux en développement, où plusieurs des membres de cette famille sont impliqués dans le guidage axonal ainsi que dans l'établissement et le maintien des connexions neurales (71,72). Ils jouent aussi des rôles importants dans le système immunitaire (73-75). Par exemple, la protéine de la famille Ig-CAM appelé VCAM-1 (« vascular cell adhesion molecule-1 ») exprimée sur les cellules endothéliales des parois vasculaire interagit avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ des lymphocytes pour le recrutement des ces derniers aux sites d'inflammation (76,77).

Plusieurs protéines de cette superfamille ont été identifiées sur les cellules de l'EPR, dont ICAM-1 (« intercellular cell adhesion molecule-1 ») (67,68), VCAM-1 (66), CE-9/OX-47 (78), 5A11 (79) et CD147 (80). Leurs rôles dans l'EPR ne sont toutefois pas identifiés.

1.4 LES INTÉGRINES

Les intégrines forment une famille de glycoprotéines transmembranaires qui assurent la médiation des processus cellulaires comme l'adhésion (cellule-cellule et cellule-matrice), la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (81-91). Les intégrines sont des molécules hétérodimériques, composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β liées ensemble de façon non-covalente. Ces sous-unités α et β s'associent entre elles pour former différentes combinaisons d'intégrines.

On connaît 8 sous-unités β et 18 sous-unités α qui s'hétérodimérisent pour former 24 intégrines identifiées jusqu'à ce jour (Tableau 1.1) (81,87,92). Suite à l'analyse du génome humain, 6 autres sous-unités α et 1 autre sous-unité β s'ajouteraient à ces intégrines déjà connues (93). Chaque intégrine possède un

ou plusieurs ligands auxquels elle peut se lier. La spécificité d'une intégrine pour un ligand est largement assumé par sa sous-unité α (87).

1.4.1 Les différents types d'intégrines

1.4.1.1 Les intégrines $\beta 1$

Des 8 groupes de sous-unités β , les intégrines $\beta 1$ sont les mieux connues. En effet, elles peuvent s'associer à 12 chaînes α différentes ($\alpha 1$ à 11 et αv) (Tableau 1.1) (81,87,92). Elles sont principalement impliquées dans les interactions cellule-matrice extracellulaire avec des molécules comme le collagène, la laminine, la fibronectine et la vitronectine. Les intégrines $\beta 1$ sont exprimées par plusieurs types de cellules, comme les fibroblastes, les leucocytes, les plaquettes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, et certaines cellules tumorales incluant les mélanomes (87).

1.4.1.2 Les intégrines $\beta 2$

Les intégrines $\beta 2$ sont principalement retrouvées à la surface des leucocytes, dont les monocytes et les macrophages (94). Elles sont importantes dans la réponse inflammatoire car elles assurent la médiation de l'agrégation plaquettaire, l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, la liaison au complément ainsi que la liaison aux agents microbiens (Gahmberg, 1997 #805,95). Les intégrines $\beta 2$ sont exprimées sur les leucocytes de façon constitutive, et sont normalement retrouvées sous leur forme inactive. Elles deviennent activées en réponse aux cytokines ou à des signaux intracellulaires (85).

TABLEAU 1.1: Les intégrines et leur(s) ligand(s).

Nom de l'intégrine	Ligand(s)
<u>Intégrines $\beta 1$</u>	
$\alpha 1\beta 1$	Collagène (types I, II, IV), Laminine
$\alpha 2\beta 1$	Collagène (types I, II, IV), Laminine, Chondroadhérine
$\alpha 3\beta 1$	Épiligrine, Laminine, Nidogène/Entactine, Fibronectine, Collagène (type 1)
$\alpha 4\beta 1$	Fibronectine, VCAM-1*
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectine
$\alpha 6\beta 1$	Laminine
$\alpha 7\beta 1$	Laminine
$\alpha 8\beta 1$	Fibronectine, Ostéopontine, Vitronectine
$\alpha 9\beta 1$	Fibronectine-alt*, Tenascin
$\alpha 10\beta 1$	Fibronectine, Collagène (types I, II)
$\alpha 11\beta 1$	Collagène (types I, II)
$\alpha v\beta 1$	Fibronectine, Vitronectine
<u>Intégrines $\beta 2$</u>	
$\alpha 2\beta 2$	ICAM*-1, -2, -3
$\alpha m\beta 2$	C3Bi*, Facteur X, Fibrinogène, ICAM*-1
$\alpha x\beta 2$	Fibrinogène, C3Bi*
$\alpha D\beta 2$	VCAM-1*
<u>Intégrines $\beta 3$</u>	
$\alpha IIb\beta 3$	Fibrinogène, Fibronectine, Facteur de von Willebrand, Vitronectine
$\alpha v\beta 3$	Fibrinogène, Fibronectine, Facteur de von Willebrand, Vitronectine, Thrombospondine
<u>Intégrines $\beta 7$</u>	
$\alpha E\beta 7$	E-Cadherin
$\alpha 4\beta 7$	Fibronectine-alt*, VCAM-1*, MAdCAM*
<u>Autres intégrines β</u>	
$\alpha 6\beta 4$	Laminine
$\alpha v\beta 5$	Vitronectine, Ostéopontine, sialoprotéine 1 de l'os
$\alpha v\beta 6$	Fibronectine
$\alpha v\beta 8$	Vitronectine

*Abréviations des ligands: VCAM-1 = « vascular cell adhesion molecule-1 », Fibronectine-alt = fibronectine, région d'épissage alternatif (voir section 1.5.1), ICAM = « intercellular cell adhesion molecule », C3bi = C3b inactivé (composante du complément), MAdCAM = « mucosal adressin cell adhesion molecule ». Tiré de (92).

1.4.1.3 Les intégrines $\beta 3$

Il n'existe que deux intégrines qui sont composées de la sous-unité $\beta 3$, l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ et l'intégrine $\alpha v\beta 3$ (Tableau 1.1). L'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ est exprimée par les plaquettes, les mégacaryocytes et les mélanomes (85). Cette intégrine semble jouer un rôle dans l'hémostase, puisque des anticorps dirigés contre elle inhibent l'agrégation plaquettaire. L'intégrine $\alpha v\beta 3$ est retrouvée à la surface d'une grande variété de cellules, comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules gliales, les ostéoblastes et les mélanomes (85). L'intégrine $\alpha v\beta 3$ joue un rôle important dans l'angiogenèse et dans la formation de métastases (96).

1.4.1.4 Les intégrines $\beta 7$

Les intégrines $\beta 7$ sont retrouvées à la surface des lymphocytes. L'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est fortement exprimée par les lymphocytes de l'intestin (97-99) et elle assure la médiation de la liaison et de l'adhésion des lymphocytes (100). La seule autre intégrine connue à posséder $\beta 7$ comme sous-unité est l'intégrine $\alpha E\beta 7$. Cette intégrine est retrouvée à la surface des lymphocytes intra-épithéliaux de plusieurs tissus, mais très peu à la surface des lymphocytes de la circulation sanguine (101). Elle a comme principal rôle l'adhésion des lymphocytes T aux cellules épithéliales (102).

1.4.1.5 Les autres intégrines β

L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est retrouvée dans les cellules épithéliales comme composante des hémidesmosomes et participe à l'adhésion des cellules épithéliales à la membrane basale (85). Elle a aussi été identifiée à la surface des cellules endothéliales et les cellules de carcinome de poumon où elle semble agir comme récepteur de la laminine (85). Les intégrines $\beta 5$ et $\beta 6$ s'hétérodimérisent chacune avec la sous-unité αv . L'intégrine $\alpha v\beta 5$ est

retrouvée à la surface des fibroblastes, les cellules de carcinome de poumon (85), les cellules musculaires lisses (103) et les gliomes (104). Elle semble aussi jouer un rôle dans la phagocytose des photorécepteurs par l'EPR (105-108), bien qu'une étude récente démontre que son rôle dans la phagocytose soit plutôt mineur (109). L'intégrine $\alpha\beta6$ est moins bien documentée. Elle est retrouvée à la surface de certaines cellules de carcinomes (85). Très peu d'informations sont disponibles sur l'intégrine $\alpha\beta8$, sinon qu'elle a été identifiée dans le placenta (85).

1.4.2 Structure des intégrines

Les intégrines possèdent des parties cytoplasmique, transmembranaire et extracellulaire (Figure 1.5). Les sous-unités α ont une masse moléculaire variant entre 120 et 180 kDa (89). Elles possèdent un court domaine

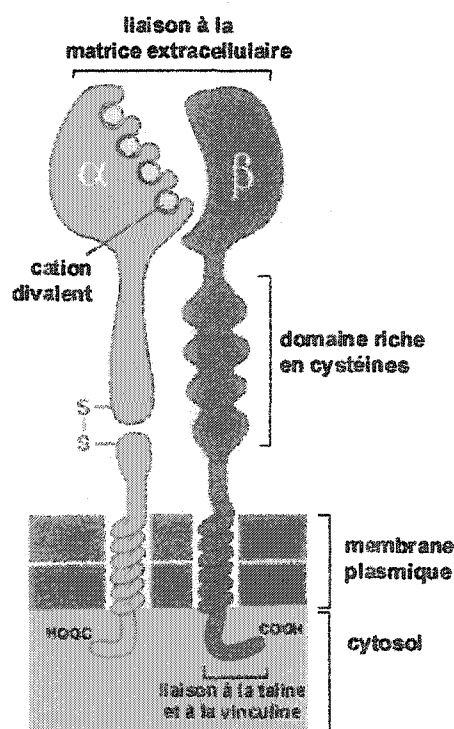


FIGURE 1.5 : Schéma d'une intégrine. Image tirée de (110)

cytoplasmique et un long domaine extracellulaire où se retrouvent plusieurs régions servant à lier des cations divalents. Ces cations sont essentiels pour le fonctionnement de cette sous-unité (82,89) (voir section 1.4.3.1). Les sous-unités β ont une masse moléculaire variant entre 90 et 110 kDa. Le domaine extracellulaire est long et possède des séquences riches en cystéines (82,89). Ces séquences semblent être reliées par des ponts disulfures (89). Les sous-unités β ont un domaine intracellulaire qui ancre les intégrines au cytosquelette de la cellule par le biais des protéines vinculine et taline.

Le modèle courant de l'organisation structurale des intégrines est largement basé sur la structure de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ qui a été cristallisée (111). Les segments NH_2 -terminaux des sous-unités α et β s'assemblent en une « tête » ovoïde d'où émerge deux « queues » presque parallèles (Figure 1.6). La tête de la sous-unité αv consiste en un domaine en éventail de feuillets- β à sept lames (chaque lame étant formée de quatre feuillets β antiparallèles) et un domaine « A » de la sous-unité $\beta 3$ (nommé βA). Cette tête a une dimension d'environ 90 Å par 60 Å par 45 Å. L'interface principale entre les 2 sous-unités se retrouve dans la tête, entre le domaine βA et le domaine en éventail de feuillets- β à sept lames d' αv , et ressemble beaucoup à l'interface $G\alpha/G\beta$ des protéines G (111).

1.4.3 Mécanisme d'activation des intégrines

De récents modèles prédisent que les intégrines peuvent exister sous de multiples états conformationnels, soit un état inactivé, activé de façon intermédiaire, ou complètement activé (112). Ces différents états confèrent à ces intégrines différentes affinités pour leur ligand (113). La liaison de l'intégrine à la matrice extracellulaire peut activer directement une signalisation cytosolique, signalisation appelée « outside-in » puisque les signaux proviennent de l'extérieur de la cellule et agissent sur l'intérieur de celle-ci (89,114). Alternativement, les intégrines peuvent aussi être activées par des

signaux appelés « inside-out », c'est à dire des signaux qui proviennent de l'intérieur de la cellule et qui se propagent vers l'extérieur de la cellule (89,114). Ces signaux semblent agir sur la partie cytoplasmique des intégrines et permettent de libérer les contraintes entre les deux sous-unités. Ce changement conformationnel permet d'exposer le site de haute affinité pour la liaison au ligand (115). L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ (116), ainsi que les autres intégrines (112), peuvent aussi être activées par des stimuli non-physiologiques comme des anticorps activateurs ou de fortes concentrations de cations divalents extracellulaires tels que le Mg^{2+} et le Mn^{2+} , dont les rôles sont expliqués dans la section suivante.

1.4.3.1 Rôle des cations divalents dans la liaison des intégrines à leur ligand.

Les réarrangements conformationnels des intégrines pour la liaison de leur ligand sont intimement reliés à leur besoin en cations divalents extracellulaires. Chaque intégrine contient trois à cinq sites de liaison pour des cations divalents dont la constante d'affinité est peu élevée (de l'ordre du μM^{-1} à mM^{-1}) (90). Suite à leur liaison, ces cations exercent des effets importants sur la fonction des intégrines (90). Collectivement, ces ions divalents peuvent agir soit 1) comme effecteurs, en favorisant la liaison de l'intégrine à son ligand, 2) comme antagonistes, en inhibant la liaison de l'intégrine à son ligand ou 3) comme sélecteurs, en changeant la spécificité de la liaison des intégrines pour leur ligand. Une hypothèse pour expliquer l'influence des cations sur les fonctions des intégrines veut que le ligand et les cations divalents partagent un site de liaison commun dans la région de l'intégrine liant le ligand. Cette hypothèse est appuyée par une étude démontrant que les ligands RGD² peuvent déplacer deux ions métalliques préalablement liés (117).

² RGD: tripeptide arginine – glycine – acide aspartique; voir aussi la section 1.5.2.

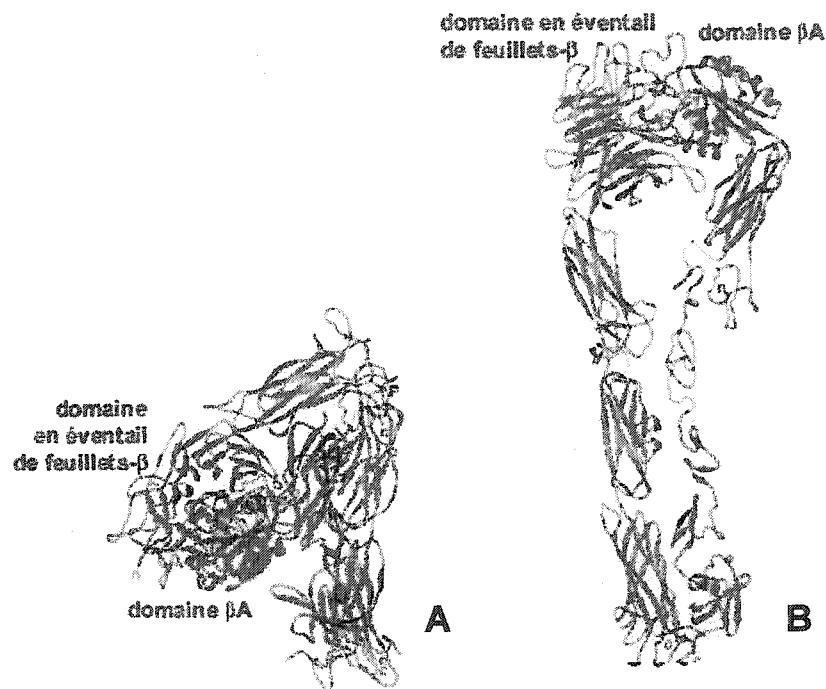


FIGURE 1.6: Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. La sous-unité α_v est représentée en bleu et la sous-unité β_3 en rouge. A) Dans le cristal, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est pliée en une région définie des queues, suggérant une flexibilité non-habituelle qui pourrait être liée à la régulation de l'intégrine, bien qu'on ne puisse exclure l'hypothèse qu'il puisse s'agir d'un artefact de la cristallisation. B) Lorsqu'allongée, chaque queue forme un mince cylindre d'environ 160 Å de long et d'environ 20 Å de diamètre. Tiré de (111).

1.5 LA FIBRONECTINE

1.5.1 Structure de la fibronectine

La fibronectine est retrouvée de façon abondante dans le plasma (300 µg/ml) et aussi de façon insoluble dans la matrice extracellulaire (118). Cette protéine est un dimère de 2 sous-unités d'environ 250 kDa. Les 2 chaînes sont liées de façon covalente près de la région C-terminale par un pont disulfure. Chaque monomère est constitué de trois types de segments répétitifs appelés type I, II et III. La fibronectine contient 12 répétitions de type I, 2 répétitions de type II et 15 à 17 répétitions de type III (Figure 1.7) (118).

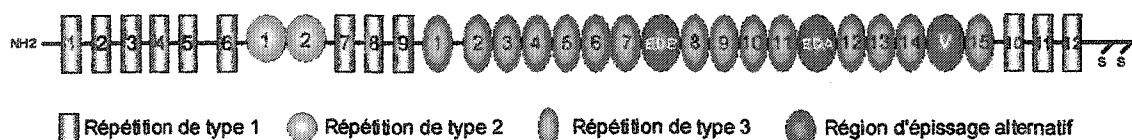


Figure 1.7 : Structure d'un monomère de la fibronectine. Tiré de (119).

Même si la molécule de fibronectine est le produit d'un seul gène, la protéine résultante peut exister sous différentes formes qui apparaissent suite à un épissage alternatif du pré-ARNm et qui peut générer, chez l'humain, près de 20 variants de fibronectine (120,121). Les principales régions d'épissage alternatif sont appelées EDB et EDA (« Extra Domain » B et A) et sont localisées respectivement entre la 7^{ème} et la 8^{ème} et entre la 11^{ème} et la 12^{ème} répétition de type III (Figure 1.7). La fibronectine plasmatique ne contient généralement pas les régions EDB et EDA. Une autre de ces régions d'épissage alternatif est retrouvée dans la région V (pour « longueur variable ») aussi appelée IIICS (« Type III Connecting Segment ») localisée entre la 14^{ème} et la 15^{ème} répétition de type III. Il existe aussi une 4^{ème} région d'épissage alternatif retrouvée dans le cartilage, où toute la région V est absente ainsi que la 15^{ème} répétition de type III et la 10^{ème} répétition de type I. Ainsi, l'épissage

alternatif du pré-ARNm permet de produire une multitude de variants, générant des fibronectines avec différents sites de liaison et différentes propriétés d'adhésion cellulaire, ce qui donne ainsi la possibilité aux cellules d'altérer précisément la composition de la matrice extracellulaire de manière spécifique d'un tissu à un autre.

1.5.2 Le site de reconnaissance RGD

La fibronectine peut servir de ligand à une douzaine d'intégrines (81) (Tableau 1.1). Un site clé pour l'adhésion de la fibronectine aux intégrines, le motif arginine-glycine-acide aspartique (RGD), a été identifié dans la 10^{ième} répétition de type III. La reconnaissance de ce simple tripeptide est complexe et dépend de sa présentation tridimensionnelle et des particularités individuelles des sites de liaison des intégrines au ligand. L'affinité des intégrines pour des peptides contenant la séquence RGD varie significativement d'une intégrine à l'autre (122,123). Les peptides contenant la séquence RGD démontrent habituellement une activité diminuée et moins spécifique comparativement à la fibronectine (124,125). Des études ont donc été entreprises pour identifier le plus petit fragment de la fibronectine étant capable de lier la cellule. Un fragment de la fibronectine de 20 kDa contenant la 9^{ième} et la 10^{ième} répétition de type III a démontré une activité adhésive semblable à la fibronectine intacte (126). Ce fragment semble donc représenter le plus petit segment fonctionnel de la fibronectine étant capable de lier la cellule.

1.5.3 Présence de la fibronectine dans la rétine

Sur des coupes de rétines humaines, la fibronectine est retrouvée sur la membrane de Bruch et autour des cellules de l'EPR (127). Il est probable qu'une grande partie de cette fibronectine proviennent des cellules de l'EPR puisque celles-ci sont capables d'en sécréter *in vitro* (127). La fibronectine est présente dans la paroi des capillaires rétiens et dans la membrane limitante

interne³ (128) (129) (130). Il n'est pas clair quelle est l'origine cellulaire de cette fibronectine. Elle pourrait provenir des cellules ganglionnaires, des astrocytes, des cellules de Müller ou des cellules endothéliales de la paroi vasculaire, puisque toutes ces cellules se trouvent à proximité de la membrane limitante interne. Il a été démontré que les cellules endothéliales (131) ainsi que les astrocytes (132) synthétisent la fibronectine. Il y a une augmentation de la fibronectine dans la rétine lors de différentes conditions pathologiques, notamment dans la vitréorétinopathie proliférante.

1.6. La vitréorétinopathie proliférante

La vitréorétinopathie proliférante est la cause la plus importante de l'échec des chirurgies de recollement de rétine (133-135). Suite à un déchirement ou un décollement de la rétine, les cellules de l'EPR qui sont normalement quiescentes et différenciées, vont se dédifférencier, se détacher de la membrane de Bruch, migrer et proliférer dans le vitré (135,136). Il se forme alors des membranes dites épirétiniennes (sur la surface de la rétine) et/ou vitréorétiniennes (dans le vitré) qui vont se contracter et tirer sur la rétine, amenant un aggravement du décollement de celle-ci (135,136).

Il a été démontré que la fibronectine était fortement exprimée dans les membranes épirétiniennes (137-141). Comme les sous-unités $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ sont présentes dans les bords des membranes de vitréorétinopathie proliférante, on suppose qu'elles interagissent avec la fibronectine dans le vitré (142). Larouche et al. (143) ont démontré une très forte stimulation de plus de 18 fois de l'activité dirigée par le promoteur du gène $\alpha 5$ lorsque des cultures de cellules épithéliales de la cornée sont cultivées en présence de fibronectine. Les résultats de Huang et Chakrabarty (144) appuient ces résultats. Ils ont en effet démontré que la présence de fibronectine stimule l'expression de son récepteur, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Du fait de cette grande importance de la fibronectine dans la vitréorétinopathie proliférante, il a été proposé que les intégrines liant la

³ Membrane limitante interne : région qui sépare la rétine du vitré

fibronectine (comme par exemple les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$) joueraient aussi un rôle important dans cette pathologie (142).

Diverses données *in vitro* et *in vivo* suggèrent que la contraction des membranes au cours de la vitréorétinopathie proliférante pourrait s'accomplir par l'intermédiaire des intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ (145-147). Par ailleurs, les disintégrines, un groupe de peptides contenant la séquence RGD et provenant de venin de vipère, inhibent la contraction de vitré des cellules de l'EPR *in vitro* et inhibent significativement le décollement de rétine chez un modèle de vitréorétinopathie proliférante du lapin (148). Ces données suggèrent que les intégrines pouvant lier la séquence RGD, comme les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$, exerceraient un rôle important dans la vitréorétinopathie proliférante.

Les études de Brem et al. (149) et de Robbins et al. (147) ont démontré que l'EPR dans la vitréorétinopathie proliférante exprime un plus grand nombre d'intégrines que dans l'EPR normal. En effet, on retrouve dans l'EPR de membranes épirétiniennes de patients souffrant de vitréorétinopathie proliférante la présence des sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ et αv (147), alors que seul les sous-unités $\beta 2$ et $\alpha 4$ étaient retrouvées dans l'EPR normal (149). Ces résultats suggèrent que dans les stades précoces de la vitréorétinopathie proliférante, l'EPR exprime de nouvelles intégrines qui facilitent sa migration, sa prolifération et son attachement au vitré ou à d'autres membranes. Des changements dans l'expression des intégrines ont donc été proposés comme étant responsables de la prolifération et de la migration de l'EPR observées suite à un décollement de la rétine (147). Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés aux intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ afin de mieux comprendre leur rôle dans la vitréorétinopathie proliférante.

1.7 L'INTÉGRINE $\alpha 4\beta 1$

L'intégrine $\alpha 4\beta 1$, aussi connue sous les noms de VLA-4 (« Very Late Antigen-4 ») et de CD49d/CD29, assure la médiation des contacts cellule-cellule et cellule-matrice par le biais de deux ligands principaux, soit le VCAM-1 et la fibronectine (150) (Tableau 1.1).

1.7.1 Interactions entre l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et la fibronectine

Les séquences de la fibronectine liant l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ont reçu beaucoup d'attention. En effet, deux séquences de la fibronectine liant cette intégrine (LDV⁴ et REDV⁵) ont été identifiées dans la région V, région retrouvée lors d'épissage alternatif (Figure 1.7) (119). Des sites additionnels de liaison, IDAPS⁶ et KLDAPT⁷, sont aussi présents dans respectivement la 14^{ème} et la 5^{ème} répétition de type III (119). De plus, il a été démontré récemment que l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (ainsi que l'intégrine $\alpha 9\beta 1$) liaient la séquence EDGIHEL⁸ localisée dans le segment d'épissage alternatif EDA, suggérant un rôle possible de ces intégrines dans la cicatrisation puisqu'une augmentation de l'expression de fibronectine contenant la région EDA est observée lors de la cicatrisation (151).

1.7.2 Expression et rôles de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$

La sous-unité $\alpha 4$ est exprimée par les cellules hématopoïétiques où elle joue un rôle clé dans la différenciation de toutes les lignées hématopoïétiques à travers ses interactions avec la fibronectine et VCAM-1 dans la matrice stromale et avec les cellules du stroma de la moelle osseuse et du foie foetal (152-154).

⁴ LDV: leucine – acide aspartique – valine

⁵ REDV: arginine – acide glutamique – acide aspartique – valine

⁶ IDAPS: isoleucine – acide aspartique – alanine – proline – serine

⁷ KLDAPT: lysine – leucine – acide aspartique – alanine – proline – thréonine

⁸ EDGIHEL: acide glutamique – acide aspartique – glycine – isoleucine – histidine – acide glutamique – leucine

La sous-unité $\alpha 4$ est exprimée avant la plupart des marqueurs spécifiques de lignées cellulaires lors des premières étapes de l'hématopoïèse (155,156). Puis, suite au processus de différenciation hématopoïétique, son expression devient restreinte à seulement quelques familles de cellules comme les lymphocytes et certaines sous familles de cellules myéloïdes (157).

L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ joue un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire. L'interaction de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (des lymphocytes) avec VCAM-1 (des cellules endothéliales activées) est responsable du recrutement des lymphocytes aux sites d'inflammation (76,77). Il n'est donc pas surprenant d'observer une fonction pour cette intégrine dans différentes pathologies inflammatoires comme l'asthme (157), les allergies (158), l'arthrite (159) et l'athérosclérose (160). Des peptides de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ont d'ailleurs atteint l'étape des essais cliniques pour, entre autre, le traitement de l'asthme, de l'arthrite et de l'athérosclérose (161,162).

Outre les cellules sanguines, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est aussi exprimée par différents types de cellules adhérentes. Elle a été détectée chez les fibroblastes du derme (163), les cellules de l'épicarde (164,165), les cellules épithéliales de la cornée (166) et les cellules de l'EPR. La sous-unité $\alpha 4$ est exprimée tôt dans le développement des muscles où elle interagit avec le ligand VCAM-1 pour assurer la médiation des interactions cellule-cellule qui sont importantes lors de la myogenèse (167,168).

Le rôle de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ dans la migration cellulaire est aussi bien documenté. La migration des cellules du tube neural et des cellules hématopoïétiques sur la fibronectine est perturbée par des anticorps qui inhibent spécifiquement la liaison entre l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et la fibronectine (169-171). Chez les embryons de souris déficients en intégrine $\alpha 4\beta 1$, les cellules progénitrices du cœur ne migrent pas sur le cœur embryonnaire pour former l'épicarde (172).

L'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ jouerait aussi un rôle dans le potentiel métastatique de certaines cellules cancéreuses. Une diminution en intégrine $\alpha 4 \beta 1$ (173) ou une diminution de l'activité transcriptionnelle du gène $\alpha 4$ (174) génère des lignées cancéreuses hautement métastatiques. Par contre, d'autres études (175-177) démontrent que plus il y a d'intégrine $\alpha 4 \beta 1$, plus les cellules forment des métastases. Ainsi, le rôle de cette intégrine dans le potentiel métastatique n'est pas encore clair.

1.7.3 Expression de l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ par les cellules de l'EPR

L'expression de l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ à la surface des cellules de l'EPR n'a pas beaucoup été étudiée. Deux études démontrent la présence de la sous-unité $\alpha 4$ *in situ* dans l'EPR (149,178). Ces données démontrent que la sous-unité $\alpha 4$ est présente sur toute la surface de l'EPR (149), avec un marquage plus intense sur la face apicale de la cellule (178). Nos résultats confirment ces données (voir chapitre 5).

Une seule étude a rapportée la présence de la sous-unité $\alpha 4$ au niveau des cellules de l'EPR *in vitro* (146). Cette étude suggère que cette sous-unité serait absente des cellules de l'EPR en culture. Par contre, nos travaux démontrent clairement que la sous-unité $\alpha 4$ est présente *in vitro* (voir chapitre 5).

Il est important de noter qu'il n'existe pas de publication ayant étudié l'activité du promoteur de la sous-unité $\alpha 4$ dans l'EPR.

1.7.4 Le promoteur du gène $\alpha 4$

Le promoteur basal et la région 5' en amont du gène de l'intégrine $\alpha 4$ ont été clonés et partiellement caractérisés (179-181). Rosen et al. (179) ont

identifié plusieurs sites de liaison pour des protéines nucléaires sur le gène de l'intégrine $\alpha 4$, soit un site AP-1 à la position +590, une boîte TATA à la position -41, des boîtes PU aux positions -54 et -67, une boîte CAAT à la position -212, un site de liaison pour MyoD à la position -274 et un site AP-1 à la position -377. Rosen et al. (180) ont identifié 3 sites de liaison pour des facteurs de transcription de la famille Ets entre les positions -76 et -42 pb, soit aux positions -50, -54 et -67. Plusieurs sites pour le facteur de transcription c-myb sont présents entre les positions -130 et -2000 pb (182). Il existe aussi deux sites de liaison ZEB (plus précisément des séquences de boîtes E) aux positions -361 et -399. Il a d'ailleurs été démontré que le facteur de transcription ZEB liait ces régions du promoteur $\alpha 4$ et qu'il agissait comme répresseur de la transcription de ce gène (183). Le gène de l'intégrine $\alpha 4$ est dépendant de la combinaison des facteurs de transcription c-myb et des facteurs de transcription de la famille à domaine Ets (182). ZEB bloque à la fois l'activité des protéines c-myb et Ets, mais c-myb et Ets agissent en synergie pour prévenir la répression de ZEB (182).

Par des études de transfections transitoires utilisant la séquence promotrice du gène $\alpha 4$ déléetée à différentes positions en 5', Audet et al. (181) ont identifié plusieurs zones de régulation importantes, communes à plusieurs types cellulaires exprimant l'intégrine $\alpha 4$. Ainsi, deux zones de régulation positive ont été identifiées entre les positions -42 et -76 pb et entre -76 et -120 pb. Ces travaux rapportent également la présence d'une zone de régulation négative située entre les positions -120 et -1000 pb. Rosen et al. (180) ont obtenu des résultats similaires et ont aussi démontré que le promoteur n'est pas actif pour des cellules n'exprimant pas $\alpha 4$. Postigo et al. (182) ont également effectué des transfections transitoires sur différents types de cellules, quatre types n'exprimant pas $\alpha 4$ et quatre autres l'exprimant. Tous les types cellulaires démontraient une régulation positive déterminée par le segment compris entre les positions -42 et -76 pb. Par contre, une forte chute de l'activité du promoteur $\alpha 4$ est observée entre les positions -300 et -400 pb lorsque transfecté dans les

cellules n'exprimant pas $\alpha 4$, alors que les cellules exprimant $\alpha 4$ démontraient une forte activité du promoteur jusqu'en position -2000 pb.

-900	TGGCTAAATA	CTCTAGCCAG	GCAAGCTCTC	TCAGTTCTTC	TACCTGGCTC	-851
-850	CTCTGGAGCC	CTCCTTATTG	CTCATCCCAT	TCTTAGCCTG	ATTCAAGATT	-801
-800	CCTGGTCCTT	CAAATCTCTC	TTTAAGTGTC	CTTACCTGGA	TCTTTCTCTA	-751
-750	GTTAGTACAA	ATTTTCTAT	CTACCATTGG	AGCGAACATT	TTTTGAAACT	-701
-700	TTGTATCAGT	CCTGCCTTAC	TCTTGGTGGA	ATCCTGTGGT	CCTAGTCAAG	-651
-650	TGCCTGCTCC	ATGAATGTGC	TGAATAAATG	AATAAGCATT	TTAATTGTGT	-601
-600	ATCTGTCATT	AGTGTGAGAT	GTGTTATTTA	TTCCAGCATG	GTTTATGAC	-551
-550	ACAGACACAC	TCTTTGATGC	AGACTTTTCT	TTTCTTTTTA	CATATAGCAA	-501
-500	CAATAAAAAA	CTAGACTTTC	ATCTCCTGAA	AATATCAGTC	TAATAATCAC	-451
-450	CTATGGCTGT	CTCTCTGGTT	GCTGAAGGAA	AAAAAAAAAA	AAGGCAGGGC	-401
-400	ZEB ACACCTGGAT	TGCATTAGAA	AP-1 TGAGACTCAC	TACCCAGTTC	AGGTGTGTTG	-351
-350	CGTTGTGGGT	CTCCGGCACA	TTTCAGAGGC	TGATTAGGAC	CCTGACCCCA	-301
-300	CACTGGGGTT	TACACCCTTA	myoD AAAGCAGGTG	TGTCCCGTGG	c-myb CAACTGAGTG	-251
-250	GGTGCGTGAA	AAGGGGGGAT	CATCAATTAC	CAGCTGGAAC	AAT CGAATCG	-201
-200	GTAAATGTG	AATCAAGTCA	CAGTGCTTCC	TTAACCCAAC	CTCTCTGTTG	-151
-150	GGGTCAGCCA	CAGCCTAAAC	CGCCTGCCGT	TCAGCCTGAG	AGGCTGCTGC	-101
-100	TAGCCTGCTC	ACGCATGCAG	CCCGGGCTGC	Ets AGA Boite PU GTG	Ets TGGGGA Boite PU	-51
-50	Ets Boite PU GTGGGT	Boite PU ATAGAAGGGT	GCTGAGATGT	GGGTCTTGAA	GAGAATAGCC	-1

FIGURE 1.8 : Séquence du promoteur du gène $\alpha 4$ (tiré de (179,181) et de la séquence GenBank # L26059). Le schéma inclut aussi les sites consensus de liaison de différents facteurs de transcription (voir section 1.7.4).

Larouche et al. (184) ont concentré leurs efforts sur la région située entre les positions -76 et -42 pb puisque celle-ci exerce une forte influence positive

sur l'activité du promoteur $\alpha 4$. Ils ont identifié 2 régions, qu'ils ont surnommé $\alpha 4.1$ et $\alpha 4.2$, responsables de la régulation positive du segment -42/-76 du promoteur $\alpha 4$. Ils ont aussi identifié 5 protéines nucléaires liant la région $\alpha 4.1$. Ces protéines n'appartiennent cependant pas à celles de la famille Ets.

1.8. L'INTÉGRINE $\alpha 5\beta 1$

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est aussi connue sous les noms de VLA-5 (« Very Late Antigen-5 ») et de CD49e/CD29. Elle fut la première intégrine liant la fibronectine à avoir été identifiée (185) et, contrairement aux autres intégrines liant la fibronectine, elle ne lie aucun autre ligand (Tableau 1.1).

1.8.1 Interactions entre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la fibronectine

En plus du tripeptide RGD, des études de mutagenèse (186,187) ont démontré que la région centrale de la 9^{ième} répétition de type III (une région appelée de « synergie » ayant la séquence en acides aminés PHSRN⁹) est importante pour une liaison de haute affinité de cette intégrine à la fibronectine.

1.8.2 Expression et rôles de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est ubiquitaire et par conséquent exprimée par une panoplie de cellules comme, entre autre, les fibroblastes (188-192), les cellules épithéliales (166) incluant l'EPR, les kératinocytes (193,194), les cellules d'une lignée de pro-monocytes (195), les leucocytes (196,197), les cellules non-neurales des nerfs en développement (198), les cellules de fibrosarcome (197,199), les cellules de mélanome (200-202) ainsi que les cellules de carcinome (203,204). En fait, il est plus difficile de trouver des cellules n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ que le contraire. Son expression est absente au niveau des lymphocytes B (197).

⁹ PHSRN: proline – histidine – sérine – arginine – asparagine

L'importance de cette intégrine dans la migration, la prolifération et la différenciation n'est plus discutable. En effet, plus d'une centaine d'articles ont traité de son expression dans ces processus cellulaires au cours des 12 dernières années. Par exemple, une diminution de l'expression d' $\alpha 5 \beta 1$ à la surface de fibroblastes diminue la migration et la prolifération de ces cellules (192). L'expression ectopique de la sous-unité $\alpha 5$ par des myoblastes empêche ces derniers de se différencier et contribue ainsi à maintenir ces cellules dans un état prolifératif (205). L'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ chute lors de la différenciation terminale des kératinocytes (193,194). Des anticorps dirigés contre l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ ou la sous-unité $\alpha 5$ empêchent l'adhésion de différentes lignées de leucocytes (196). L'adhésion d'une lignée cellulaire de mélanome humain à la fibronectine est surtout assurée par la médiation de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ (202).

L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ semble aussi être impliquée dans le phénomène de dépendance à l'ancrage, plus communément désigné sous le terme d'« anoïkis ». L'anoïkis se définit comme une apoptose induite par des interactions cellule-matrice extracellulaire inadéquates ou inappropriées (206). Puisque l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire est assuré par la médiation des intégrines, plusieurs études ont tenté de déterminer quelles intégrines étaient importantes dans la médiation des signaux de survie (207). Bien que plusieurs intégrines soient impliquées dans ce processus, l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ semble particulièrement importante pour certaines lignées cellulaires. Les cellules CHO (« chinese hamster ovary ») et les cellules HUVEC (« human umbilical vein endothelial cells ») sont protégées de l'anoïkis lorsqu'elles se lient à la fibronectine en utilisant l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ (208,209). Des résultats similaires ont été obtenus par Lee et Juliano (210) qui ont démontré que la surexpression de la sous-unité $\alpha 5$ et la liaison de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ à la fibronectine protégeaient les cellules de la lignée RIE1 (cellules épithéliales de l'intestin de rat) de l'apoptose. La surexpression de la sous-unité $\alpha 5$ protège aussi les cellules HT-

29 (carcinome du colon humain) de l'apoptose induite par l'absence de sérum dans le milieu de culture (211).

1.8.3 Expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ par les cellules de l'EPR

Il existe une controverse dans la littérature quant à l'observation *in situ* de la sous-unité $\alpha 5$ au niveau de l'EPR. Deux études soulignent l'absence de la sous-unité $\alpha 5$ (149,212), alors qu'une autre note la présence de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ au niveau des cellules de l'EPR (213). Dans cette dernière étude, le marquage de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ à la surface des cellules de l'EPR est situé du côté basolatéral. Nos mesures contribuent à clarifier cette controverse (voir chapitre 3).

La présence de la sous-unité $\alpha 5$ *in vitro* est bien documentée (62,146,214-220). De plus, son expression à la surface de la cellule varie selon le stade de confluence (62,146,214,219). Les cellules non-confluentes démontrent un marquage hétérogène, en agglomérat à la surface cellulaire ainsi qu'un marquage à la bordure de la membrane cellulaire (214,219), alors que le marquage pour les cellules confluentes se retrouve surtout au pourtour des cellules, i.e. au contact cellule-cellule (62,146,214). Nos résultats confirment ces données (voir chapitre 4).

Afin de mieux comprendre les variations de l'expression cellulaire de la sous-unité $\alpha 5$ à la surface des cellules de l'EPR, il serait important de comprendre comment son promoteur est régulé, ce qui n'a pas encore été réalisé chez l'EPR.

1.8.4 Promoteur du gène $\alpha 5$

Le promoteur basal et la région 5' en amont du gène de l'intégrine $\alpha 5$ ont aussi été clonés et partiellement caractérisés (197). La région 5' en amont du gène de l'intégrine $\alpha 5$ ne contient pas de boîte TATA, ni de boîte CCAAT.

Plusieurs sites de liaison pour des protéines nucléaires comme AP-2 à la position +80, AP-1 à la position -48, Sp1 aux positions -96, -115 et -255 et Ets aux positions -299 et -644 ont été identifiés (197). Il existe aussi des sites Sp1 aux positions -56 (221) et -72 (143) ainsi qu'un site C/EBP à la position -70 (221).

Des travaux réalisés par le groupe de Corbi et al. (221) démontrent la liaison des facteurs de transcription Sp1, AP-1 et C/EBP aux régions -56, -48 et -70 du promoteur $\alpha 5$, respectivement. Cette étude démontre que AP-1 agit comme régulateur positif, tandis que C/EBP agit comme régulateur négatif de la transcription du gène $\alpha 5$. Gingras et al. (222) ont démontré que les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 liaient la région située entre -92 et -132 pb et qu'ils agissaient comme régulateurs positifs de la transcription. En effet, lorsque les cellules épithéliales de cornées de lapin atteignent la quiescence, il s'en suit une forte réduction de la transcription du gène $\alpha 5$ qui serait la conséquence d'une forte réduction de l'expression des facteurs de transcription positifs Sp1 et de Sp3 (222).

Les études de transfections transitoires de Birkenmeier et al. (197) utilisant la séquence promotrice du gène $\alpha 5$ délétée à différentes positions en 5' ont montré une faible activité du promoteur à partir de la position -27 jusqu'à -62, puis une forte augmentation de l'activité du promoteur entre -62 et -132 pb et des diminutions successives lorsque la séquence promotrice est allongée jusqu'à la position -657. Les résultats de transfections transitoires de Gingras et al. (222) sont également en accord avec ces observations. Chez les cellules de l'épithélium cornéen non-confluentes, l'activité du promoteur $\alpha 5$ est très faible pour les plasmides recombinants portant un segment du promoteur $\alpha 5$ allant jusqu'à la position -92 pb. Un élément de régulation positive puissant (entre -92 et -132 pb) ainsi qu'un élément de régulation négative (entre -178 et -954 pb) ont également été identifiés dans le promoteur $\alpha 5$ (222).

-900	TTGGGTCCCT	TTCGAAGACT	TTCCACCACC	ACCACCACCT	CTCACAATTC	-851	
-850	TCCAGGTTTG	TAGGAACCCG	GCCAGTTTAA	TCAAGCAGGT	ACTGAGGGGC	-801	
-800	CAGCCACTCG	CAGGCTTTTG	GTCAACTGTC	AGATCCAAGG	AAGGGGCTCA	-751	
-750	GCAGAGGTTT	ACATACCCTA	GGACCAAGAA	GGGGGCAAAC	TGGAGGAGAA	-701	
-700	TCCTCCTGAT	GAATGACCCC	AAACTCCTGG	GTTTTCATA	CTGAAGAAGC	-651	
-650	TTGGAGGAG	Ets GCAGCGGA	ACTTGAGGAG	CCCGTGTAGG	TCCTCTAGCA	-601	
-600	AGCTGACTGC	GAACGCTGTC	TCTGTACCTC	AACTGTTGTG	TCCCAAATCC	-551	
-550	AGCTGGCCAG	AACCCAGGCA	CCCGGCGGCC	CCGGAAGGCA	AGGGGGAATC	-501	
-500	CCAGTTGGCC	GGACGCCAGA	GGAGTCTCCT	GTCTCTTTAG	ACCCCAAAGT	-451	
-450	CTCCTCCCTA	AAGCACTGAG	GGAGACCCCA	CACACATATA	CAGGCTTCCT	-401	
-400	CCGCCCACCA	GAGGTGATTC	CTTTCCTCAT	TAGGAAATTC	TCCGCTCCCT	-351	
-350	TTTCCGACTC	GTTTTCCGAG	CGTTTACGTT	GTACATCTGG	AAAGGAATGG	-301	
-300	GGA	Ets GGA	GGGGGAAGCA	GAGAGGAGGG	GGAAGAACCC	Sp1 AAACCCGCCC	-251
-250	AGTCTAACCC	AGTCCAGACA	ACCGGCTTCC	AGCTGGGGCT	GGGGAAAGGG	-201	
-200	GGTTGGAGGG	GTGCGCCCCC	CCCCCACGCC	CCTTAGGGGT	GGGGGACGCG	-151	
-150	GGCTCAGAGT	TTCCAGGGAC	CCAGGAATGC	Sp1 CCCCCGCCA	GCCCCCTCGG	-101	
-100	Sp1 CAGGCGGGG	GAGGGCTCAG	Sp1 CCGGGAGTTT	Sp1 GGCAA	Sp1 ACTCC	Sp1 TCCCCGCGTT	-51
-50	AP-1 GAGTCATTCG	CCTCTGGGAG	GTTTAGGAAG	C/EBP CGGCTCCGGG	TCGGTGGCCC	-1	

FIGURE 1.9 : Séquence du promoteur du gène $\alpha 5$ (tiré de (197) et de la séquence Genbank # U48214). Le schéma inclut aussi les sites consensus de liaison ainsi que les régions connues liant différents facteurs de transcription (voir section 1.8.4).

1.9 OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE PROPOSÉS

Plusieurs objectifs ont été fixés pour mes études à la maîtrise et au doctorat, qui ont été divisés en 4 chapitres.

1.9.1 Objectifs du chapitre 2

Les biologistes cellulaires s'accordent à dire que plusieurs variables affectent la cellule en culture (milieu de culture, densité cellulaire, passage, ...). Après avoir effectué de multiples transfections transitoires, nous avons remarqué que les activités dirigées par le promoteur $\alpha 5$ variaient considérablement entre les différentes cultures utilisées. Nous nous sommes demandés si ces variations étaient dues aux conditions de cultures utilisées et avons donc évalué l'influence de certains paramètres de culture sur l'activité dirigée par le promoteur du gène $\alpha 5$.

Les objectifs de ce chapitre étaient donc les suivants :

- 1) Évaluer par des transfections transitoires l'effet des passages sur la force du promoteur $\alpha 5$ des cellules de l'EPR.
- 2) Évaluer par transfections transitoires et par immunoprécipitation l'effet de la cryopréservation sur la force du promoteur $\alpha 5$ et sur la quantité de protéine $\alpha 5\beta 1$ à la surface des cellules de l'EPR.

1.9.2 Objectifs du chapitre 3

In vivo, les cellules de l'EPR sont différenciées et mitotiquement inactives. Lorsqu'elles sont mises en culture, elles se dé-différencient et prolifèrent puis, lorsqu'elles atteignent la quiescence, elles se re-différencient. On pourrait alors s'attendre à ce que, lors de la prolifération ou de la différenciation des cellules de l'EPR *in vitro*, il y ait expression de nouvelles intégrines qui ne seraient pas présentes à l'état normal (*in vivo*), ou encore disparition d'intégrines *in vitro* qui se retrouveraient normalement exprimées *in vivo*. A cet égard, Wang et al.

(199) ont démontré que lorsque les cellules HT1080 (fibrosarcome) sortent de la quiescence, il y a stimulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$. Ainsi, l'utilisation des cellules de l'EPR en culture pourrait servir de modèle pour l'étude de la régulation de l'expression des intégrines car, en distinguant les cellules proliférantes des cellules différenciées, il devient possible de mieux comprendre les variations d'expression des intégrines lors du processus de différenciation, ou de dé-différenciation, tel qu'observé lors de la vitréorétinopathie proliférante (section 1.6). Nous avons donc porté une attention particulière aux conditions de culture, en mesurant l'expression des intégrines dans des cellules dé-différenciées et proliférantes, des cellules quiescentes ayant amorcé une différenciation *in vitro*, ainsi que des cellules complètement différenciées *in situ*.

Les objectifs de ce chapitre étaient donc les suivants :

- 1) Déterminer par un test d'incorporation au bromodéoxy uridine à quel stade les cellules devenaient quiescentes en culture.
- 2) Déterminer par immunofluorescence si la sous-unité $\alpha 5$ était présente sur des coupes de rétines humaines *in situ* et sur des cellules proliférantes et quiescentes *in vitro*.
- 3) Vérifier par immunoprécipitation et par RT-PCR semi-quantitatif s'il y avait des variations dans l'expression de la sous-unité $\alpha 5$, autant au niveau de la protéine que du transcrit, lorsque l'EPR proliférant devenait quiescent.
- 4) Évaluer par des transfections transitoires si les différences notées au niveau du transcrit étaient aussi retrouvées au niveau du promoteur.

1.9.3 Objectifs du chapitre 4

Travailler avec du tissu humain demeure une tâche très contraignante puisque l'avancement des travaux dépend, entre autre, de la disponibilité des donneurs et de la « fraîcheur » des tissus. Nous nous sommes demandé s'il n'était pas possible d'utiliser une lignée cellulaire, la lignée ARPE-19, pour la

suite de nos travaux. La ARPE-19 est une lignée cellulaire humaine non-transformée, apparue spontanément en culture (223) provenant d'un donneur de 19 ans. Cette lignée cellulaire possède plusieurs caractéristiques des cellules de l'EPR, incluant la morphologie cellulaire, des jonctions étanches fonctionnelles, et elle exprime des marqueurs spécifiques d'EPR différencié comme le CRALBP et la protéine RPE65. Lors des études réalisées avec cette lignée, nous avons aussi évalué l'influence du milieu de culture sur la régulation du promoteur $\alpha 5$.

Les objectifs de ce chapitre étaient donc de :

- 1) Déterminer par immunofluorescence si la sous-unité $\alpha 5$ était exprimée par les cellules de la lignée ARPE-19.
- 2) Vérifier si les changements d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ des cellules ARPE-19 proliférantes et quiescentes étaient similaires à ceux observés avec les cultures primaires. Nous avons mesuré les changements d'expression de la protéine par immunoprécipitation, du transcrit par RT-PCR semi-quantitatif et du promoteur par transfections transitoires.
- 3) Évaluer par des transfections transitoires l'effet du milieu de culture sur l'activité du promoteur $\alpha 5$.

1.9.4 Objectifs du chapitre 5

Comme décrit à la section 1.7.3, peu de choses sont connues sur l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ par les cellules de l'EPR. Nous avons voulu mieux caractériser son expression chez les cellules de l'EPR humain.

Les objectifs de ce chapitre étaient donc de :

- 1) Vérifier par immunofluorescence la présence de la sous-unité $\alpha 4$ sur des coupes de rétines humaines *in situ*, et sur nos cellules *in vitro*.

- 2) Évaluer l'expression d' $\alpha 4$ au niveau du transcrit par RT-PCR semi-quantitatif et du promoteur par des transfections transitoires.

CHAPITRE 2

LOSS OF INTEGRIN α 5 SUBUNIT EXPRESSION AFTER CRYOPRESERVATION AND SEVERAL PASSAGES OF HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS

Manuscrit soumis à la revue Molecular Vision

en tant que « Technical brief »

**Loss of integrin $\alpha 5$ subunit expression after
cryopreservation and several passages of human
retinal pigment epithelial cells**

Stéphanie Proulx^{1,3}, Sylvain L. Guérin² and Christian Salesse^{1,3}

¹Université du Québec à Trois-Rivières, Dept. Chimie-Biologie,
Trois-Rivières, Québec, Canada

²Oncology and Molecular Endocrinology Research Center,
Centre Hospitalier de l'Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada

³Unité de Recherche en Ophtalmologie, Centre de Recherche du Centre
Hospitalier de l'Université Laval, Ste-Foy, Quebec, Canada

Contact information: Christian Salesse, Unité de Recherche en
Ophtalmologie, Centre de Recherche du CHUL, Pavillon CHUL, 2705 Boul.
Laurier, Ste-Foy, Quebec, Canada, G1V 4G2, phone: (418) 656-4141 ext 7243,
fax: (418) 654-2131, e-mail: christian.salesse@crchul.ulaval.ca

2.1 RÉSUMÉ

But : Cette étude a été réalisée afin d'évaluer l'effet des passages et de la cryopréservation sur l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien en culture. **Méthodes :** Pour l'effet des passages, nous avons effectué des transfections transitoires du promoteur $\alpha 5$ dans des cellules de l'EPR en culture aux passages 2, 3 et 4. Des cellules ont également été cryopréservées pendant 20 semaines dans l'azote liquide et transfectées avec des plasmides contenant différents délétants du promoteur du gène $\alpha 5$. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a aussi été immunoprécipitée avant et après la cryopréservation afin d'évaluer l'effet de la méthode de préservation sur l'activité du promoteur $\alpha 5$ et la quantité de protéine $\alpha 5\beta 1$ à la surface cellulaire. **Résultats :** Pour le plasmide -954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, une diminution de l'activité du promoteur de $62\pm 8\%$ et de $67\pm 10\%$ entre les passages 2 et 3, et une diminution additionnelle de $47\pm 10\%$ et de $47\pm 5\%$ entre les passages 3 et 4 a été observée pour les deux donneurs testés. L'activité du promoteur $\alpha 5$ diminue de $64\pm 9\%$, $73\pm 13\%$ et $57\pm 10\%$ suite à sa transfection dans des cellules d'EPR cryopréservées pendant 20 semaines dans l'azote liquide pour les donneurs de 48, 22 et 44 ans, respectivement. Des réductions similaires ont aussi été observées suite à la congélation dans différents milieux de cryopréservation. Les résultats d'immunoprécipitation ont démontré qu'il y avait aussi une diminution de la quantité de protéine $\alpha 5\beta 1$ à la surface des cellules suite à la cryopréservation et ce indépendamment du milieu de cryopréservation utilisé. **Conclusions :** Cette étude démontre que la congélation et les passages ont pour effet de diminuer l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'EPR *in vitro*. Ces résultats illustrent aussi l'importance d'utiliser des conditions de cultures précises et constantes afin d'obtenir des résultats cohérents lors des études d'expression de l'intégrine $\alpha 5$ (et possiblement des autres intégrines) dans des cultures primaires d'EPR.

2.2 ABSTRACT

Purpose: The present study was undertaken to investigate the effect of multiple passaging and cryopreservation of cultured human RPE cells on the expression of the integrin $\alpha 5$ subunit. **Methods:** Transient transfections of the integrin $\alpha 5$ gene promoter were conducted in human RPE cells cultured at different passages. These cells were also cryopreserved for 20 weeks in liquid nitrogen, unfrozen and transfected at passage 2. **Results:** For the -954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS plasmid, a $62 \pm 8\%$ and $67 \pm 10\%$ decrease in promoter strength is observed between passages 2 and 3, and an additional $47 \pm 10\%$ and $47 \pm 5\%$ decrease is observed between passages 3 and 4 for the 47 and the 22 years-old donors, respectively. Strength of the $\alpha 5$ promoter decreased $64 \pm 9\%$, $73 \pm 13\%$ and $57 \pm 10\%$ after cryopreservation for 20 weeks for the 48, 22 and 44 years-old donors, respectively. Different cryomedia solutions were also tested, but resulted in similar reductions of the $\alpha 5$ promoter strength. Immunoprecipitation analyses demonstrated a decrease in $\alpha 5$ subunit protein levels when cells were stored in liquid nitrogen for 20 weeks, regardless of the cryomedia solution used. **Conclusions:** The present study shows that freezing and multiple passaging of RPE cells has the undesirable effect of decreasing integrin $\alpha 5$ subunit expression. These results show the importance of having precise and constant culture conditions in order to obtain coherent results when studying integrin expression in primary cultures of human RPE cells.

2.3 INTRODUCTION

The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of polarized epithelial cells located between the photoreceptor outer segments of the neural retina and the choroidal blood supply [1]. RPE cells have many metabolic and biochemical functions essential for maintaining retinal integrity, such as phagocytosis of rod and cone outer segments, metabolism of vitamin A, transport of metabolites to and from the visual cells and choroid, synthesis and replacement of melanin granules, maintenance of the blood-ocular barrier and adhesion of the retina. At their basal surface, the RPE basement membrane is separated from the basement membrane of the choroidal capillaries by the Bruch's membrane. The Bruch's membrane is composed of a number of extracellular matrix (ECM) macromolecules such as type I, III and IV collagen, laminin and fibronectin, which are also synthesized by RPE cells in vitro [2]. The interactions between a cell and its ECM are, in part, mediated by a family of cell surface glycoproteins called integrins [3, 4]. Integrins mediate cell-cell and cell-ECM adhesion [3, 4]. Binding of integrins to their ligand(s) influences cell activities including proliferation, migration, and differentiation [3, 4]. Integrins are heterodimers consisting of variable α and β subunits, and the different combinations of these subunits determine the receptor specificity for the different ECM molecules [3, 4]. The major fibronectin receptor is the $\alpha 5 \beta 1$ integrin [3-5]. The integrin $\alpha 5$ subunit has been previously identified in human RPE cells [6, 7] and was shown to be important for adhesion since antibodies to $\alpha 5$ inhibit adhesion of RPE cells to ECM [8].

The present study was conducted in order to evaluate the effect of passage number and cryopreservation on the transcriptional activity directed by the $\alpha 5$ promoter in primary cultures of human RPE cells. It was found that all culture conditions decreased the $\alpha 5$ promoter strength. These results emphasize the importance of having precise and constant culture conditions when using primary cultured cells for conducting gene expression studies.

2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Cell cultures

Primary cultures of RPE cells were established from adult human eyes obtained from the National Eyebank Inc. (Québec, QC, Canada) within 24h of death. This research was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki. Dissection was done by a modification of a previously published method [9]. Cells were cultured with Keratinocyte-SFM medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 5% bovine calf serum (Hyclone, Logan, Utah, USA) and 200 mg/ml albumax, 45 mg/ml ascorbic acid, 1 mg/ml carnitine, 500 mg/ml glucose, 112 mg/ml fructose, 5 mg/ml glutathione, 6 mg/ml hypoxanthine, 67 mg/ml oxalacetic acid, 0.15 mg/ml retinol acetate, 5 mg/ml taurine, 0.025 mg/ml, D- α -tocopherol, 50 mg/ml transferrin and 0.3 mg/ml uridine. Medium was changed every 2-3 days and cultures were maintained at 37°C under 5% CO₂. For the cell passages analysis, cells were passaged at a cell density of 5×10^4 cells/cm² and left for 1 week in culture before being used for transient transfection studies.

2.4.2 Cryopreservation

Primary cultures of human RPE cells were trypsinized and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. The pellet was resuspended in 1 ml cryomedium. Three different cryomedia were used: cryomedium 1 (67% growth medium, 5% serum, 10% polyvinylpyrrolidone (PVP; Sigma, Oakville, ON, Canada), 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma), 8% glucose (Sigma)); cryomedium 2 (90% serum, 10% DMSO); cryomedium 3 (80% growth medium, 10% serum, 10% glycerol (Sigma)). Tubes were slowly cooled to -80°C and transferred into liquid nitrogen until further use. After 20 weeks in liquid nitrogen, tubes were rapidly thawed in a water bath at 37°C. Cells were rinsed with warm growth medium and put in

culture for 1 week at 5×10^4 cells/cm² before being used at passage 2 for immunoprecipitation or transient transfection studies.

2.4.3 Immunoprecipitation

Fresh or cryopreserved RPE cells at passage 2 plated at 2.5×10^4 cells/cm² were harvested after 2-3 days in culture and 5×10^6 cells/ml were labeled with 1 mg/ml soluble Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL) for 60 min at room temperature (RT). Cells were then lysed in 1ml lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 1% Igepal CA-630, 120 mM NaCl, 1mM CaCl₂·2H₂O, 1mM MgCl₂, 0.7 µg/ml pepstatin, 0.5 µg/ml leupeptin, 1mM pefabloc). Protein concentration was measured with the BCA method (Pierce) to ensure that equal amounts of protein were loaded in each lane. Each ml of supernatant was pre-cleared by a 1h incubation with 50 µl of unconjugated protein-A-Sepharose CL-4B beads (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Quebec)¹⁰. Approximately 50 µl of packed goat anti-mouse IgG coated sepharose beads (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) was incubated for 3h at RT with 10 µg primary antibody (mouse anti-human integrin $\alpha 5$, clone IIA1, Pharmingen), then rinsed with wash buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) to remove unbound antibodies. Pre-cleared samples (500 µl) were precipitated for 3h at RT with 50 µl of protein-sepharose/anti-mouse IgG with bound primary antibody. The Sepharose beads with bound immune complexes were washed 6 times in wash buffer. Then 50 µl of non-reducing 2X Laemmli buffer was added to the 50 µl of rinsed beads, boiled 5 min at 85°C, cooled, and 20 µl was loaded (corresponding to 1×10^6 immunoprecipitated cells) on a 6% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). The membrane was blocked for at least 1h with 3% BSA, incubated for 1h with

¹⁰ L'étape de pré-clarification sert à éliminer les protéines qui se lient de façon non-spécifique aux billes de protéine-A-Sépharose.

streptavidin-HRP (Pierce), rinsed in PBS containing 0.05% Tween 20, incubated for 15 min with Supersignal (Pierce) and processed for autoradiography. Band density was evaluated using the Visage 110S Bioimage analyzer (Millipore, USA).

2.4.4 Transient transfections and CAT assays

Plasmids containing the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene from the plasmid pSKCAT fused to various 5' deletions of the $\alpha 5$ gene and stripped of their multicloning site (MCS) (-954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS and -178 $\alpha 5$ CAT Δ MCS) have been previously described [10]. For the effects of cell passages and cryopreservation, RPE cells were plated at a density of 2.5×10^4 cells/cm² and incubated for 2h at 37°C before transfection. Transfections were conducted by the calcium phosphate precipitation procedure as described by Graham et al. [11]. Each individual plate received 15 μ g of test plasmid and 5 μ g of the human growth hormone (hGH)-encoding plasmid pXGH5 [12] for 4h before being washed with PBS and incubated a further 48h in fresh medium. Levels of CAT activity for the transfected cells were determined as described [13] and normalized to the amount of hGH secreted into the culture media and assayed using a kit for quantitative measurement of hGH (Immunocorp, Montréal, Canada). The value presented for each individual test plasmid transfected corresponds to the mean of at least two separate transfections done on different donors, each in triplicate. To be considered significant, each individual value needed to be at least three times over the background level caused by the reaction buffer used. Standard deviation is also provided for each transfected CAT plasmid. Statistical analysis was performed using ANOVA (see legend to graphics for p values).

2.5 RESULTS

2.5.1 Effect of cell passages

Primary cells in culture have a limited number of cell divisions before they reach cellular senescence. Rawes et al. [14] showed that a subculture of adult RPE cells reached replicative failure after 15 population doublings, and Li et al. [15] found that bovine RPE became senescent after 26 population doublings. We wanted to verify whether proliferation of RPE cells in vitro affects the expression of the $\alpha 5$ integrin. This was performed by comparing the strength of the $\alpha 5$ gene promoter in RPE cells transfected at different passages.

Cells were plated and transient transfections were done using the -954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS recombinant plasmid which bears the longest 5'-flanking DNA segment from the $\alpha 5$ gene and is thus the closest relative to the native gene. For both donors tested, a strong reduction in the $\alpha 5$ promoter strength was observed with increasing cell passages (Figure 2.1). A $62 \pm 8\%$ and $67 \pm 10\%$ decrease in promoter strength was observed between passages 2 and 3 for both the 47 and 22 years old donors, respectively. An additional $47 \pm 10\%$ and $47 \pm 5\%$ decrease is observed between passages 3 and 4. These results correspond to an overall reduction of $83 \pm 8\%$ and $80 \pm 16\%$ between passages 2 and 4 for the 47 and the 22 years-old donors, respectively.

2.5.2 Effect of cryopreservation

We next examined whether freezing cells in liquid nitrogen would affect the expression of the $\alpha 5$ integrin subunit. We routinely cryopreserved RPE cells in a cryomedium consisting of 67% growth medium, 5% serum, 10% PVP, 10% DMSO and 8% glucose named cryomedium 1 [Personal communication from Dr. B. A. Pfeffer, modified solution taken from [16]]. Using this cryomedium, transient transfections studies showed a $64 \pm 9\%$ and a $73 \pm 13\%$ reduction of the

-954 α 5CAT Δ MCS promoter activity for the 48 and the 22 years-old donors, respectively (Figure 2.2 A and B). For the shorter construct -178 α 5CAT Δ MCS, a 74 \pm 18% and a 74 \pm 15% reduction was observed for both the 48 and the 22 years-old donors, respectively.

Different cryosolutions often used in cell culture were then tested to find a proper medium that would maintain the highest α 5 promoter strength. After 20 weeks in liquid nitrogen in the three cryomedia tested, RPE cultures from a 44 years-old donor showed a substantial decrease in the α 5 promoter strength for both plasmids tested (see Figure 2.2C). With the -954 α 5CAT Δ MCS plasmid, the reduction in promoter strength for cells cryopreserved in cryomedia 1, 2 and 3 is respectively diminished by 57 \pm 10%, 51 \pm 6% and 60 \pm 5% when compared to fresh cells at the same passage number. For the shortest construct, -178 α 5CAT Δ MCS, the reduction in promoter strength was even more important, decreases of 80 \pm 7%, 82 \pm 15% and 78 \pm 17% being observed with cryomedia 1, 2 and 3, respectively.

To verify whether the decrease observed in the activity directed by the α 5 promoter also translated into a similar decrease in the expression of the α 5 subunit at the protein level, immunoprecipitation of cell surface proteins before and after cryopreservation was performed. As shown on Figure 2.3, and consistent with previously published results [17-20], two bands of 145 kDa and 116 kDa corresponding to both the α 5 and β 1 integrin subunits, respectively, were observed. In agreement with the promoter strength data, a substantial decrease in integrin α 5 levels at the RPE cell surface when cells have been stored in liquid nitrogen for 20 weeks was observed, regardless of the cryomedia solution used. The Visage 110S Bioimage analyzer revealed reductions in the amount of α 5 protein of 56%, 37% and 54% for cryomedia 1, 2 and 3, respectively, whereas β 1 expression was reduced by 56%, 60% and 72%, when compared to unfrozen (fresh) cells.

2.6 DISCUSSION

Cell passaging has the advantage of yielding more cells for further use in various types of experiments. However, considering that human RPE cells senesce after 15 population doublings [14], extensive proliferation of RPE cells in vitro might result in undesirable effects on the cell's behavior. The present study was thus undertaken to investigate the effect of multiple passaging of primary cultures of human RPE cells on the expression of the integrin $\alpha 5$ subunit whose expression has been previously reported in these cells [6, 7, 21-26]. We found that a decrease in the strength of the $\alpha 5$ integrin gene correlated well with increasing cell passages. These data suggest that extensive proliferation of RPE cells in vitro is detrimental for integrin $\alpha 5$ expression. This is in accordance with a previous study which demonstrated that the human RPE cell line RPE 340 had an altered mRNA phenotype when it was grown to replicative exhaustion (senescence) [27]. Indeed, insulin growth factor binding protein 2 mRNA was found to be upregulated whereas mRNAs encoding for collagen I alpha 2, basic fibroblast growth factor, and fibroblast growth factor-5 were all downregulated [27].

Inadequate techniques of preservation decreases the viability of the cells before transplantation by damaging cells through intracellular ice formation during freezing/thawing steps. It also seems that culturing human cells before freezing helps them support the cryopreservation process. Indeed, Durlu and Tamai [28] have shown that uncultured fetal human RPE cryopreserved in 90% FBS /10% DMSO (same as cryomedium 2 used in this paper) were shown to be non-viable after 4 months in liquid nitrogen. However, culturing these cells before cryopreservation increased their viability, such cells being still viable after 5 months of preservation in liquid nitrogen. In this study, we also found that cultured human RPE cells were viable after 20-21 weeks in liquid nitrogen. Consequently, different cryosolutions might be more appropriate for the freezing of uncultured cells.

We tested three different cryomedia and found a downregulation in promoter strength and protein levels of the integrin $\alpha 5$ subunit following cryopreservation. No significant protection from this downregulation was observed between the three different cryosolutions. Reduction of the $\alpha 5$ subunit following cryopreservation could be explained by alterations in the transcription of the $\alpha 5$ gene and consequently, in the amount of $\alpha 5$ protein expressed at the cell surface. Indeed, Basu et al. [29] found an increase in abnormal chromosomes in cultured bovine RPE cells after freezing, which further increased after cell passages. Moreover, Honda et al. [30] found that cryopreservation induced premature induction of senescence in the human RPE cell line RPE340. If both cryopreservation and extensive proliferation induces senescence, our results could mean that a general transcriptional down regulation occurs that affect the activity of the $\alpha 5$ integrin gene (and most probably of other genes as well) when RPE cells are in the process of reaching senescence.

The present study shows that cryopreservation and multiple passaging of RPE cells result in a substantial reduction in the expression of the $\alpha 5$ integrin subunit. These results also highlight the importance of having precise culture conditions in order obtain coherent results. Our results might be of a substantial contribution to researchers who study RPE cells for transplantation as a mean of preserving vision in patients suffering from photoreceptor loss, such as in age-related macular degeneration [28, 31-37]. A possible approach to autologous RPE transplantation would be to harvest autologous RPE from peripheral RPE biopsies, culture these cells, and then transplant them during a second surgical procedure [38]. Another approach to RPE transplantation that has been proposed [28, 39] is to use cryopreserved allogeneic donor RPE cells. Cryopreservation would have the advantage of permitting HLA-typing [39, 40] to match congenic samples which would minimize the risks of rejection. Many variables need to be considered when culturing RPE cells for transplantation.

The present study shows that cryopreserving and multiple passaging of RPE cells has the undesirable effect of decreasing expression of the $\alpha 5$ integrin subunit. For transplantation purposes, considerations should be taken as for the use of RPE cells that have had multiple passaging or that have been cryopreserved.

The reduction in both promoter strength and protein level seen in our experiments could be lessened by improving culture conditions. Using membrane currents generated by Ca^{2+} channels as a marker of cell differentiation, Valtink et al. [39] showed that RPE cells maintained RPE-specific cell differentiation and characteristics in vitro after primary culture and cryopreservation when cultured in an improved growth medium. This growth medium consisted of basal medium F99 (1:2 dilution of medium 199 in Ham's F12), 15% choroid-conditioned medium, 10% fetal calf serum, 1mM sodium pyruvate, 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin and antibiotics [39]. The content of the conditioned medium is unknown [41], but its beneficial effect has been proven [39, 40]. Alternatively, since culturing rabbit corneal epithelial cells [42] and RPE cells [43] on components from the ECM upregulates expression of integrin receptors, plating RPE cells on fibronectin may help in maintaining $\alpha 5$ expression following cryopreservation. Culturing the cells for longer periods of time might also help them recover from the stressful freeze/thaw procedure.

2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the National Eyebank inc. (CHUL, Quebec, Canada) for providing us with post-mortem human eyes. We also would like to thank Marcelle Giasson (from the CHUL Research Center) for her precious help with the CAT assays. Supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). SP held a scholarship from the NSERC and was supported by a joint scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the E.A. Baker Foundation from the Canadian National

Institute for the Blind (CNIB). CS and SLG are chercheur boursier national from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

2.8 REFERENCES

1. Marmor MF. Structure, function and disease of the retinal pigment epithelium. In: Marmor Mf and Wolfensberger Tj, editors. The Retinal Pigment Epithelium. Oxford University Press; 1998. p. 3-9.
2. Campochiaro PA, Jerdan JA and Glaser BM. The Extracellular Matrix of Human Retinal Pigment Epithelial Cells In Vivo and its Synthesis In Vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 1986; 27:1615-21.
3. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 1992; 69:11-25.
4. Elnar SG and Elnar VM. The integrin superfamily and the eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996; 37:696-701.
5. Aota S and Yamada KM. Fibronectin and cell adhesion: specificity of integrin-ligand interaction. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 1995; 70:1-21.
6. Hunt RC, Pakalnis VA, Choudhury P and Black EP. Cytokines and serum cause alpha 2 beta 1 integrin-mediated contraction of collagen gels by cultured retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35:955-63.
7. McKay BS, Irving PE, Skumatz CM and Burke JM. Cell-cell adhesion molecules and the development of an epithelial phenotype in cultured human retinal pigment epithelial cells. Exp Eye Res 1997; 65:661-71.

8. Kim KS, Tezel TH and Del Priore LV. The reattachment of adult human retinal pigment epithelium (RPE) to extracellular matrix (ECM) is mediated mainly by beta1 integrin subunit. [ARVO Abstract]. *Inves Ophthalmol Vis Sc* 1998; 39:S98. Abstract nr. 461.
9. Pfeffer BA. Improved Methodology for Cell Culture of Human and Monkey Retinal Pigment Epithelium. In: Osborne N and Chader J, editors. *Progress in retinal Research*. Vol 10. Pergamon Press; 1991. p. 251-91.
10. Beliveau A, Leclerc S, Rouleau M and Guerin SL. Multiple cloning sites from mammalian expression vectors interfere with gene promoter studies in vitro. *Eur J Biochem* 1999; 261:585-90.
11. Graham FL and van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973; 52:456-67.
12. Selden RF, Howie KB, Rowe ME, Goodman HM and Moore DD. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol Cell Biol* 1986; 6:3173-9.
13. Pothier F, Ouellet M, Julien JP and Guerin SL. An improved CAT assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells. *DNA Cell Biol* 1992; 11:83-90.
14. Rawes V, Kipling D, Kill IR and Faragher RG. The kinetics of senescence in retinal pigmented epithelial cells: a test for the telomere hypothesis of ageing? *Biochemistry (Mosc)* 1997; 62:1291-5.
15. Li W, Yanoff M, Li Y and He Z. Artificial senescence of bovine retinal pigment epithelial cells induced by near-ultraviolet in vitro. *Mech Ageing Dev* 1999; 110:137-55.

16. Zavala ME. Ultrastructural changes in cultured sugarcane (*Saccharum sp.*) cells following the addition of cryoprotectants at 2 temperatures. *Cryo-lett* 1983; 4:371-80.
17. Adams JC and Watt FM. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. *Cell* 1990; 63:425-35.
18. Hynes RO. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48:549-54.
19. Nadanaka S, Sato C, Kitajima K, Katagiri K, Irie S and Yamagata T. Occurrence of oligosialic acids on integrin alpha 5 subunit and their involvement in cell adhesion to fibronectin. *J Biol Chem* 2001; 276:33657-64.
20. Yin Z, Gabriele E, Leprini A, Perris R and Colombatti A. Differential cation regulation of the alpha 5 beta 1 integrin-mediated adhesion of leukemic cells to the central cell-binding domain of fibronectin. *Cell Growth Differ* 1997; 8:1339-47.
21. Anderson DH, Guerin CJ, Matsumoto B and Pfeffer BA. Identification and localization of a beta-1 receptor from the integrin family in mammalian retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:81-93.
22. Yang CH, Huang TF, Liu KR, Chen MS and Hung PT. Inhibition of retinal pigment epithelial cell-induced tractional retinal detachment by disintegrins, a group of Arg-Gly-Asp-containing peptides from viper venom. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:843-54.

23. Zhao MW, Jin ML, He S, Spee C, Ryan SJ and Hinton DR. A distinct integrin-mediated phagocytic pathway for extracellular matrix remodeling by RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2713-23.
24. Mousa SA, Lorelli W and Campochiaro PA. Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Biochem* 1999; 74:135-43.
25. Jin M, He S, Worpel V, Ryan SJ and Hinton DR. Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:4324-32.
26. Meitinger D, Hunt DM, Shih DT, Fox JC and Hunt RC. Vitreous-induced modulation of integrins in retinal pigment epithelial cells: effects of fibroblast growth factor-2. *Exp Eye Res* 2001; 73:681-92.
27. Matsunaga H, Handa JT, Gelfman CM and Hjelmeland LM. The mRNA phenotype of a human RPE cell line at replicative senescence. *Mol Vis* 1999; 5:39.
28. Durlu YK and Tamai M. Transplantation of retinal pigment epithelium using viable cryopreserved cells. *Cell Transplant* 1997; 6:149-62.
29. Basu PK, Sarkar P, Menon I, Carre F and Persad S. Bovine retinal pigment epithelial cells cultured in vitro: growth characteristics, morphology, chromosomes, phagocytosis ability, tyrosinase activity and effect of freezing. *Exp Eye Res* 1983; 36:671-83.
30. Honda S, Weigel A, Hjelmeland LM and Handa JT. Induction of telomere shortening and replicative senescence by cryopreservation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282:493-8.

31. Peyman GA, Blinder KJ, Paris CL, Alturki W, Nelson NC, Jr. and Desai U. A technique for retinal pigment epithelium transplantation for age-related macular degeneration secondary to extensive subfoveal scarring. *Ophthalmic Surg* 1991; 22:102-8.
32. Yamaguchi K, Gaur VP and Turner JE. Retinal pigment epithelial cell transplantation into aging retina: a possible approach to delay age-related cell death. *Jpn J Ophthalmol* 1993; 37:16-27.
33. Algvere PV, Berglin L, Gouras P and Sheng Y. Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994; 232:707-16.
34. Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y and Kopp ED. Transplantation of RPE in age-related macular degeneration: observations in disciform lesions and dry RPE atrophy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997; 235:149-58.
35. Kaplan HJ, Tezel TH and Del Priore LV. Retinal pigment epithelial transplantation in age-related macular degeneration. *Retina* 1998; 18:99-102.
36. Del Priore LV, Kaplan HJ, Tezel TH, Hayashi N, Berger AS and Green WR. Retinal pigment epithelial cell transplantation after subfoveal membranectomy in age-related macular degeneration: clinicopathologic correlation. *Am J Ophthalmol* 2001; 131:472-80.
37. Binder S, Stolba U, Krebs I, Kellner L, Jahn C, Feichtinger H, et al. Transplantation of autologous retinal pigment epithelium in eyes with foveal neovascularization resulting from age-related macular degeneration: A pilot study. *Am J Ophthalmol* 2002; 133:215-25.

38. Ishida M, Lui GM, Yamani A, Sugino IK and Zarbin MA. Culture of human retinal pigment epithelial cells from peripheral scleral flap biopsies. *Curr Eye Res* 1998; 17:392-402.
39. Valtink M, Engelmann K, Strauss O, Kruger R, Loliger C, Ventura AS, et al. Physiological features of primary cultures and subcultures of human retinal pigment epithelial cells before and after cryopreservation for cell transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237:1001-6.
40. Ventura AC, Bohnke M, Loliger C, Kuhn P, Winter R and Engelmann K. [HLA typing of donor corneas with extended post mortem time]. *Ophthalmologie* 1996; 93:262-7.
41. Ham RG and McKeehan WL. Media and growth requirements. In, eds. *Methods in enzymology*. Vol LVIII. New York: Academic Press; 1979. p. 44-93.
42. Larouche K, Leclerc S, Salesse C and Guerin SL. Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro. *J Biol Chem* 2000; 275:39182-92.
43. Geng L and Del Priore LV. Pre-transplant exposure to extracellular matrix (ECM) ligands alters integrin expression of RPE surface. [abstract]. 2002 Annual Meeting Abstract and Program Planner [on CD-ROM]; Association for Research in Vision and Ophthalmology. Abstract 3443.

2.9 FIGURES

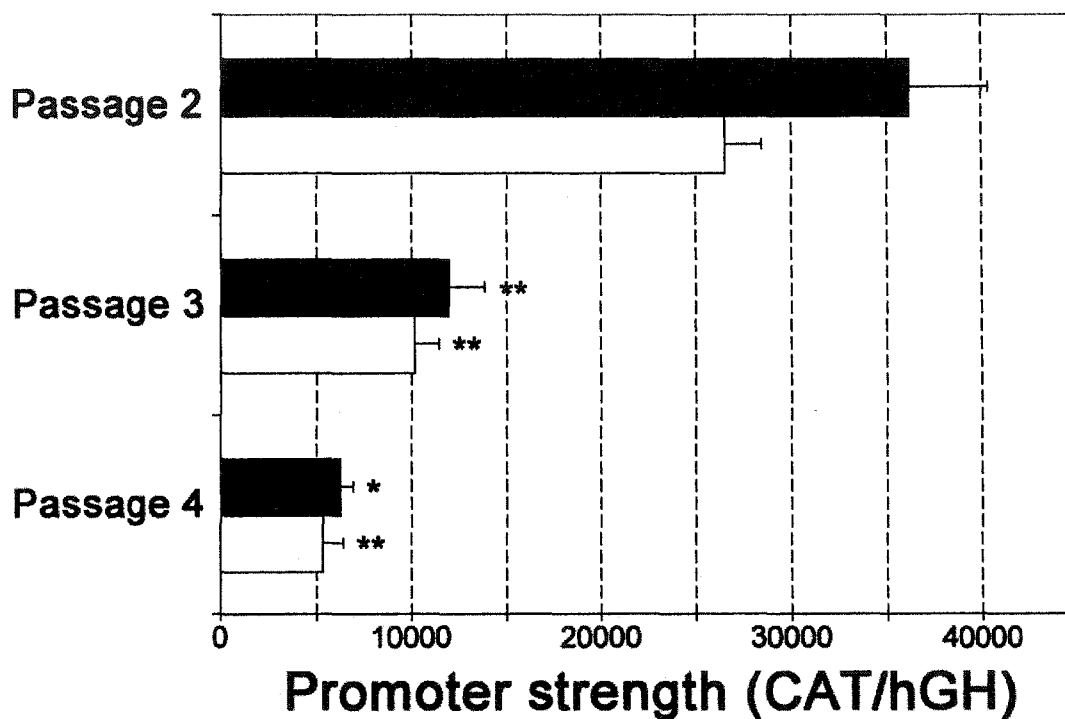


Figure 2.1 Effect of RPE cell passage on the activity directed by the $\alpha 5$ integrin gene promoter. Cells at different passages were transiently transfected with the -954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS plasmid. Mean promoter strength of a 22 years-old donor (black box) and a 48 years-old donor (white box) is shown along with standard deviations (n=6). An asterisk above the histogram indicates a promoter activity statistically different (ANOVA; *p<0.005, **p<0.001) from their respective previous passage.

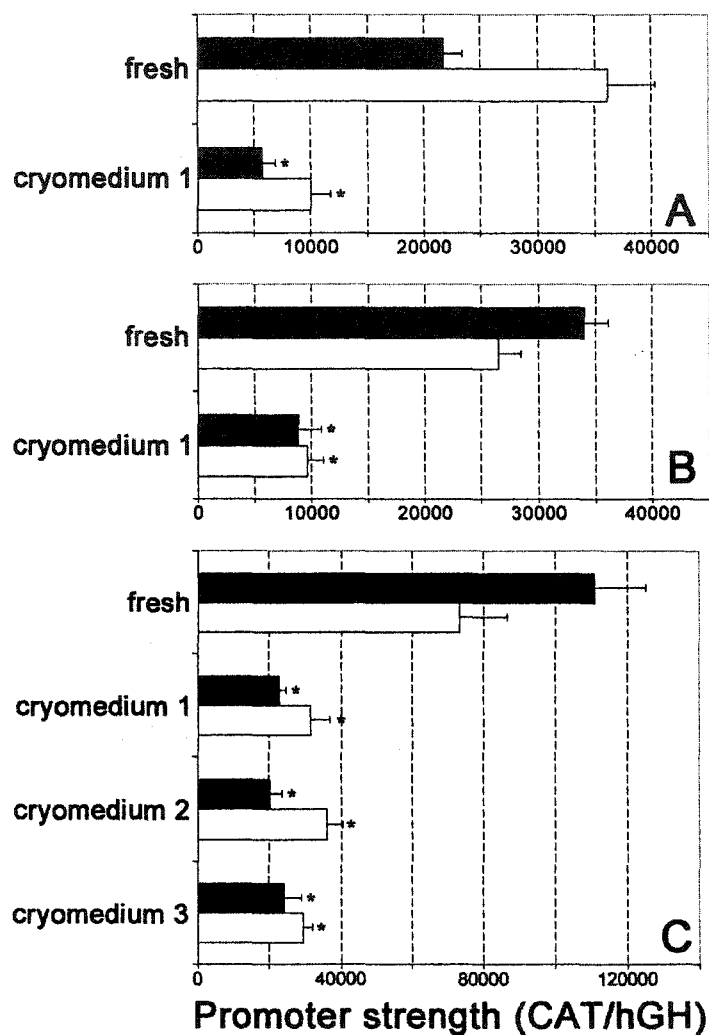


Figure 2.2 Effect of cryopreservation on the activity directed by the $\alpha 5$ integrin gene promoter. Cells at passage 0 were cryopreserved for 20 weeks in liquid nitrogen and used at passage 2 for transient transfection and compared to fresh cells from the same donor (also used at passage 2). Transient transfections were done using the -178 $\alpha 5$ CAT Δ MCS plasmid (black box) and the -954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS plasmid (white box). Figure shows mean promoter strength (\pm SD, n=6) of (A) a 22 years-old donor using cryomedium 1, (B) a 48 years old donor using cryomedium 1 and (C) a 44 years-old donor using 3 different cryomedia. An asterisk above the histogram indicates a promoter activity statistically different (ANOVA; p<0.001) from their respective value for fresh (not cryopreserved) cells.

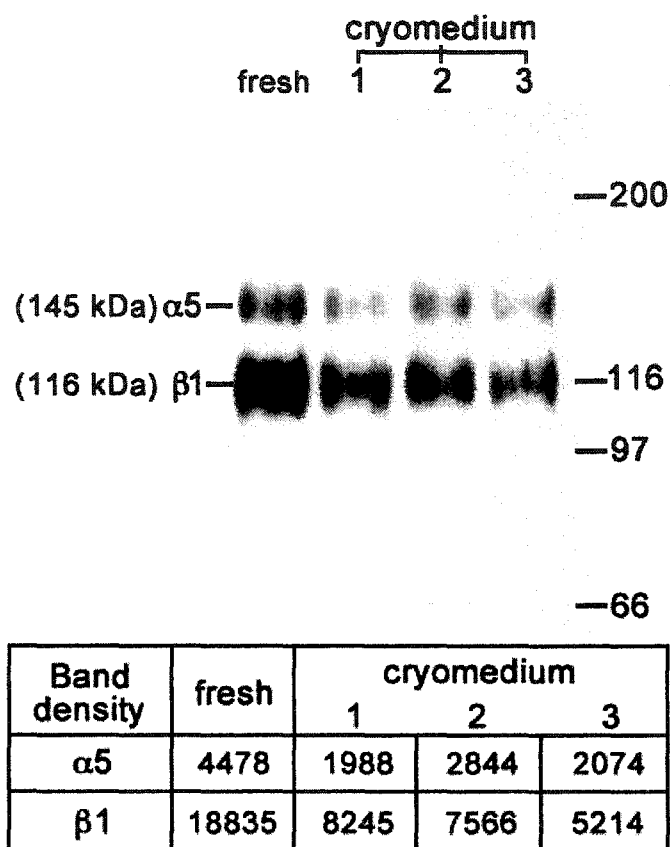


Figure 2.3 Effect of cryopreservation on the amount of integrin $\alpha 5$ at the RPE cell surface. *Upper panel.* Cells at passage 0 were cryopreserved for 20 weeks in either cryomedium 1, 2 or 3 in liquid nitrogen and used at passage 2 for immunoprecipitation and compared to fresh cells of the same donor (also used at passage 2). *Lower panel.* The bands from the autoradiogram corresponding to both fragments from the $\alpha 5\beta 1$ integrin were scanned using a Visage 110S Bioimage analyzer in order to quantify the alterations found in the amount of this integrin when using the various cryomedia.

CHAPITRE 3

EFFECT OF QUIESCENCE ON INTEGRIN $\alpha 5 \beta 1$ EXPRESSION IN HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIUM

Article publié dans la revue

Molecular Vision (2003) 9:473-481

**Effect of quiescence on integrin $\alpha 5\beta 1$ expression
in human retinal pigment epithelium**

Stéphanie Proulx^{1,3}, Sylvain L. Guérin² and Christian Salesse^{1,3}

¹Université du Québec à Trois-Rivières, Dept. Chimie-Biologie,
Trois-Rivières, Québec, Canada

²Oncology and Molecular Endocrinology Research Center,
Centre Hospitalier de l'Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada

³Unité de Recherche en Ophtalmologie, Centre de Recherche du Centre
Hospitalier de l'Université Laval, Ste-Foy, Quebec, Canada.

Contact information: Christian Salesse, Unité de Recherche en
Ophtalmologie, Centre de Recherche du CHUL, Pavillon CHUL, 2705 Boul.
Laurier, Ste-Foy, Quebec, Canada, G1V 4G2, phone: (418) 656-4141 ext 7243,
fax: (418) 654-2131, e-mail: christian.salesse@crchul.ulaval.ca

3.1 RÉSUMÉ

But : L'EPR est différencié et mitotiquement inactif dans l'œil normal. Cependant, lors de différentes pathologies comme la vitréorétinopathie proliférante, ces cellules se dé-différencient et prolifèrent dans le vitré et/ou sur la rétine. Il a été proposé que les intégrines, une famille de protéines d'adhésion, soient responsables du comportement aberrant qu'adoptent les cellules de l'EPR lors de la vitréorétinopathie proliférante. Le but de cette étude est d'évaluer l'expression (protéique et génique) de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ des cellules de l'EPR proliférantes et des cellules quiescentes.

Méthodes : Un essai d'incorporation au bromodéoxy uridine a été réalisé afin de déterminer l'état prolifératif ou quiescent des cellules. L'expression de la protéine $\alpha 5$ a été évaluée *in situ* par immunohistochimie et *in vitro* à différentes confluences cellulaires par immunoprécipitation. Des analyses de RT-PCR semi-quantitatif et de transfections transitoires ont été réalisées afin d'évaluer si l'augmentation de la confluence altérait le niveau d'expression du transcrit et l'activité du promoteur $\alpha 5$.

Résultats : Nous avons démontré que la sous-unité $\alpha 5$ est exprimée à la surface de l'EPR *in situ* et *in vitro* et que la quantité de protéine varie selon la confluence cellulaire. Des résultats similaires ont été observés au niveau du transcrit. Les résultats de transfections transitoires ont démontré que l'activité du promoteur $\alpha 5$ augmentait légèrement entre les cellules non-confluentes et confluentes, et diminuait de façon significative entre les cellules confluentes et post-confluentes. Ces résultats ont aussi permis de démontrer que le promoteur $\alpha 5$ possède une région de forte régulation positive située entre les positions -41 et -92 pb et des régions de régulation négatives situées entre les positions -92 et -178 pb.

Conclusions : Cette étude démontre que la quiescence cellulaire affecte l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ au niveau du gène et de la protéine. Les cellules hautement proliférantes expriment un haut niveau de protéine et de transcrit $\alpha 5$, qui corrèle également avec la forte activité du promoteur $\alpha 5$ observée dans ces cellules. Lorsque les cellules atteignent la quiescence, l'activité du promoteur devient fortement réprimée, le

niveau de transcrit $\alpha 5$ est diminué et les cellules expriment beaucoup moins de protéine $\alpha 5\beta 1$ à leur surface cellulaire.

3.2 ABSRACT

Purpose: The retinal pigment epithelium (RPE) is differentiated and mitotically inactive in the normal eye, but several pathologies such as proliferative vitreoretinopathy (PVR) cause RPE cells to dedifferentiate and resume proliferation. Integrins, a family of cell surface glycoproteins that mediate cell proliferation and differentiation, are thought to play fundamental roles in PVR. The aim of this study was to evaluate protein expression and gene regulation of the integrin $\alpha 5$ subunit in proliferating and quiescent RPE cells.

Methods: Protein expression was studied in situ by immunohistochemistry and in vitro at different cell confluences by immunoprecipitation. Semi-quantitative RT-PCR and transient transfections were used to determine whether increasing cell confluence also affected $\alpha 5$ subunit mRNA levels and promoter activity, respectively. **Results:** We demonstrated that the integrin $\alpha 5$ subunit is present at the RPE cell surface both in situ and in vitro, and that $\alpha 5$ protein level is influenced by confluence. Levels of integrin $\alpha 5$ transcripts are similar for sub-confluent and confluent cells, and a small increase in the promoter activity was observed between sub-confluent and confluent cells. However, both the integrin $\alpha 5$ subunit transcript and the $\alpha 5$ promoter activity decreased when cells reached post-confluence. **Conclusions:** We demonstrated that cell confluence affected protein and gene expression of the integrin $\alpha 5$ subunit. Proliferating RPE cells expressed high levels of both the $\alpha 5$ protein and mRNA transcripts and showed a high promoter activity. However, when cells reached quiescence, $\alpha 5$ gene expression was substantially reduced and RPE cells expressed little $\alpha 5$ protein at their cell surface.

3.3 INTRODUCTION

The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of polarized epithelial cells located between the photoreceptor outer segments of the neural retina and the choroidal blood supply [1]. RPE cells have many metabolic and biochemical functions essential for maintaining retinal integrity, such as phagocytosis of rod and cone outer segments, transport of metabolites to and from the visual cells and choroid, maintenance of the blood-ocular barrier and adhesion of the retina [1]. At their basal surface, the RPE basement membrane is separated from the basement membrane of the choroidal capillaries by the Bruch's membrane. The Bruch's membrane is composed of a number of extracellular matrix (ECM) macromolecules such as type I, III and IV collagen, laminin and fibronectin (FN), which are also synthesized by RPE cells in vitro [2]. Studies of cultured RPE cells have shown that they attach to and spread on individual matrix molecules such as collagen [3], laminin [4, 5] and FN [5], as well as on ECM produced by various cell lines [3-6].

The interactions between a cell and its ECM are, in part, mediated by a family of cell surface glycoproteins called integrins [7, 8]. Signals transduced by integrins can influence cell adhesion, migration, differentiation and proliferation [7, 8]. Integrins are heterodimers consisting of variable α and β subunits. The different combinations of these subunits determine the receptor specificity for the different ECM molecules [7, 8]. Although integrins often bind to more than one ligand, some show selectivity. It is the case for the $\alpha 5 \beta 1$ integrin which binds specifically to FN [7-9]. The $\alpha 5 \beta 1$ integrin has been shown to mediate adhesion to FN for a number of cell types, including leukemic cells [10], mammary carcinoma cells [11], and RPE cells [12]. Cell spreading and proliferation are inhibited in $\alpha 5$ -deficient NRK fibroblasts [13], whereas mammary carcinoma cell proliferation is inhibited by antibodies to $\alpha 5 \beta 1$ [11]. Furthermore, $\alpha 5 \beta 1$ has been shown to mediate migration of aortic endothelial

cells [14], fibroblasts [15] and RPE cells [16] on FN, a further evidence that $\alpha 5\beta 1$ also promotes cell proliferation and migration.

The FN integrin $\alpha 5\beta 1$ also appears to play pathogenic roles in a variety of proliferative diseases. Indeed, changes in $\alpha 5\beta 1$ expression have been correlated with malignancy of uveal melanoma [17]. Robbins et al. [18] showed the presence of the $\alpha 5$ subunit (amongst others) on pigmented cells (presumably of RPE origin) from proliferative vitreoretinopathy (PVR) membranes and concluded that its presence was abnormal when compared to the lack of $\alpha 5$ staining on normal retina [19].

Integrins have been postulated to play a major role in PVR [7, 18], a pathology in which normally quiescent and differentiated RPE cells detach from the underlying Bruch's membrane, migrate and proliferate [20-22]. When RPE cells are cultured, they dedifferentiate, migrate and proliferate very much the same as those in PVR. Studying integrin expression of cultured RPE cells, and comparing integrin expression on proliferating and quiescent cells, could thus help understand the involvement of integrins in PVR.

Given the importance of the $\alpha 5\beta 1$ integrin in cell adhesion, proliferation and migration, we sought to investigate the $\alpha 5\beta 1$ protein expression and gene regulation in proliferating and quiescent human RPE cells. We determined if the integrin $\alpha 5$ subunit was present at the RPE cell surface in situ and in vitro and examined the $\alpha 5$ mRNA transcribed in human RPE cells in vitro at different cell confluences. We also assessed whether the changes in the amounts of $\alpha 5$ mRNA in vitro found with increasing cell confluence were reflected by differences in the transcriptional activity directed by the $\alpha 5$ gene promoter.

Our results demonstrate that the integrin $\alpha 5$ subunit is present at the RPE cell surface both in vitro and in situ, and that its expression is modulated with

cell quiescence. Proliferating (sub-confluent and confluent) RPE cells have similar amounts of $\alpha 5$ protein and $\alpha 5$ mRNA transcripts, and both protein and mRNA expression are downregulated when RPE cells become quiescent. A small increase in $\alpha 5$ promoter activity is however observed between sub-confluent and confluent RPE cells, although promoter activity also decreases when cells become quiescent, providing further evidences that cellular quiescence dictates the level to which the $\alpha 5$ integrin is expressed in RPE cells.

3.4 METHODS

3.4.1 Cell cultures

Cultures of primary RPE cells were established from eyes of 14 human donors (age range: 6 days-old to 48 years-old, mean = 22 years-old) obtained from the National Eyebank Inc. (Québec, Qc, Canada) within 24h of death. This research was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki. Dissection was done by a modification of a previously published method [23]. Cells were cultured with Keratinocyte-SFM medium (Canadian Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 5% bovine calf serum (Hyclone, Logan, Utah, USA) and 200 mg/ml albumax, 45 mg/ml ascorbic acid, 1 mg/ml carnitine, 500 mg/ml glucose, 112 mg/ml fructose, 5 mg/ml glutathione, 6 mg/ml hypoxanthine, 67 mg/ml oxalacetic acid, 0.15 mg/ml retinol acetate, 5 mg/ml taurine, 0.025 mg/ml, D- α -tocopherol, 50 mg/ml transferrin and 0.3 mg/ml uridine. Medium was changed every 2-3 days and cultures were maintained in an incubator at 37°C in 5% CO₂/95% air atmosphere. For all experiments, cultures were used at passage 2 and cells were plated at different densities as follows: non-confluent cells: 2.5×10^4 cells/cm², 2 days in culture; confluent cells: 1.5×10^5 cells/cm², 2 days in culture; post-confluent cells: 1.5×10^5 cells/cm², 2 weeks in culture.

3.4.2 Bromo-deoxyuridine labeling

DNA synthesis of RPE cells at different confluence was monitored by the addition of the thymidine analogue bromo-deoxyuridine (BrdU) (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) to the culture medium (final concentration 10 μ M). Labeling was allowed for 24h upon which time cells were washed and fixed with an ethanol fixative (70% ethanol, 50 mM glycine, pH 2.0) for 30 min at -20°C. Incorporated BrdU was detected by immunofluorescence. Briefly, RPE cells were first incubated with a mouse anti-BrdU antibody (clone BRD.2; Mediacorp, Montreal, Quebec, Canada) diluted 1:50 in PBS containing 3000 U/ml of Exonuclease III (Sigma) and 150 U/ml of restriction endonuclease SAU 3A I (Sigma) for 30 min at 37°C, followed by incubation with a secondary antibody (anti-mouse IgG-TRITC conjugated; Sigma) for 30 min at 37°C. After 3 other washes in PBS and 2 final washes in distilled water, the coverslips were mounted on a microscope slide and fixed with nailpolish. The fluorescence was observed with an epifluorescence microscope (Nikon Diaphot 300). For negative controls, the primary antibody was replaced by PBS-BSA1%. The results shown are representative of a minimum of 3 independent experiments conducted on separate RPE populations derived from different donors.

3.4.3 Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 2 different human donor eyes (a 21 years-old donor and a 81 years-old donor). We obtained the eyes respectively 15.5h and 4h post-mortem, and they were immediately fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 24h at 4°C. Following incubation in 20% sucrose for 2h at room temperature and 30% sucrose for 24h at 4°C, eyes were embedded in OCT and frozen in liquid nitrogen. Sections of 10 μ m were cut using a Leitz 1720 digital cryostat, collected on superfrost/plus Fisherbrand slides (Fisher scientific, Nepea, Ontario, Canada) and stored at -80°C until use. Sections were incubated for 20 min at room temperature in 95% ethanol, and

then treated with 0.25% potassium permanganate for 15 min at room temperature [24] to reduce autofluorescence arising from lipofuscin present in RPE [25]. Blocking buffer and antibodies were diluted in 0.3% BSA in PBS. Sections were blocked overnight at 4°C in 5% goat serum (Vector Laboratories, Burlington, Ontario, Canada), then incubated for 90 min at 37°C with rabbit anti-integrin $\alpha 5$ polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA), or with normal rabbit serum (Sigma) for negative control, both at a concentration of 103 $\mu\text{g/ml}$. Sections were blocked again in 5% goat serum for 60 min at 37°C, and incubated with secondary antibody labeled with Alexa Fluor 488 at a 1:100 dilution (Molecular Probes, Eugene, OR) for 90 min at 37°C. Sections were mounted with Prolong antifade mounting medium (Molecular Probes). Images were obtained using a MRC 1024 confocal system (Bio-Rad) mounted on a Nikon Diaphot TMD inverted microscope equipped with 60X 1.4 N.A. immersion optics. Confocal 8 bit images were captured using Bio-Rad's Lasersharp acquisition software running under OS2.

In order to distinguish residual autofluorescence from specific immunoreactivity, images were obtained as described in Kennedy et al. [26]. Briefly, sections were subjected to sequential excitation with the 488 nm line (green) and the 568 nm line (red) of the krypton/argon laser. Autofluorescent materials have broad spectral properties and are visible at both 488 nm and 568 nm excitation. By contrast, the Alexa Fluor green fluorescence is visible only with the 488 nm excitation. By this method, autofluorescent components appear orange/yellow and specific immunoreactivity appears green.

3.4.4 Immunoprecipitation

RPE cells were harvested, cell density was adjusted to 5×10^6 cells/ml and labeled with 1 mg/ml soluble Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL) in PBS for 60 min at room temperature. Cells (5×10^6 cells) were then lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 1% Igepal CA-630, 120 mM NaCl,

1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1mM MgCl_2 , 0.7 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1mM pefabloc). Insoluble materials were removed by centrifugation at 16 000 g for 10 min at 4°C. Protein concentration was measured with the BCA method (Pierce) to ensure that equal amounts of protein were loaded in each lane. Each ml of supernatant was pre-cleared by a 1h incubation with 50 μl of unconjugated protein-A-Sepharose CL-4B beads (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Quebec, Canada). Approximately 50 μl of goat anti-mouse IgG coated sepharose beads (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) was incubated for 3h at room temperature with 10 μg primary antibody (mouse anti-human integrin $\alpha 5$, clone IIA1, Pharmingen), then rinsed with wash buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5M NaCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 0.1% Tween 20) to remove unbound antibodies. Pre-cleared (500 μl) samples were precipitated for 3h at room temperature with 50 μl of protein-sepharose/anti-mouse IgG with bound primary antibody. The Sepharose beads with bound immune complexes were washed 6 times in wash buffer. Then, 50 μl of 2X Laemmli buffer containing 5% 2-mercaptoethanol was added to the 50 μl of rinsed beads, boiled for 5 min at 85°C, cooled, and 20 μl was loaded per lane (corresponding to 7.5×10^5 immunoprecipitated cells) on a 6% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). The membrane was blocked for at least 1h with 3% BSA, incubated for 1h with streptavidin-HRP (Pierce) and processed for autoradiography. Band density was evaluated using the QuantityOne 1-D image analysis software (Bio-Rad Laboratories).

3.4.5 Semi-quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

RNA from RPE cells at different confluences was isolated using the Tri-Reagent (Sigma) according to the manufacturer's instruction. Reverse transcription (RT) was performed using 5 μg total RNA and 0.2 μg of random hexamer primers (Fermentas; Burlington, Ontario, Canada) following the manufacturer's protocol for synthesis of first strand cDNA. Polymerase chain

reaction (PCR) was performed using the QuantumRNA 18S Internal standards protocol for semi-quantitative RT-PCR (Ambion, Austin, Texas) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the linear range of the $\alpha 5$ PCR product was determined using RNA from sub-confluent, confluent and post-confluent RPE. PCR products were in the linear range between 23 and 33 cycles for sub-confluent and confluent cells, and between 25 and 31 for post-confluent cells. The total number of cycles used for semi-quantitative RT-PCR was 28. The QuantumRNA 18S Internal standard (Ambion) used comes with 18S primers and 18S competimers that competes one another to decrease 18S PCR product in order to co-amplify and detect both 18S and gene specific PCR products. The optimal ratio of 18S primers: competimers was determined and the ratio used was 2:8 (18S primers:competimers). Bands were analyzed with the GelDoc2000 gel documentation system (Bio-Rad Laboratories) and the QuantityOne 1-D image analysis software (Bio-Rad Laboratories). Semi-quantitative RT-PCR was done twice in duplicate on 4 different donors. The DNA sequence of the primers used for the amplification of the human $\alpha 5$ transcript were: forward primer: 5'-GGCAGCTATGGCGTCCCACTGTGG-3', reverse primer: 5'-GGCATCAGAGGTGGCTGGAGGCTT-3' (171-bp PCR product) and cycle parameters were 94°C for 30sec, 60°C for 30sec and 72°C for 30sec. The 18S primers (Ambion) gave a PCR product of 489 bp.

3.4.6 Transient transfections and CAT assays

Plasmids containing the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene from the plasmid pSKCAT fused to various 5' deletions of the $\alpha 5$ gene and stripped of their multicloning site (MCS) (-954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -178 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -132 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -92 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -41 $\alpha 5$ CAT Δ MCS) have been previously described [27]. RPE cells at different confluences were transiently transfected using the calcium phosphate precipitation method as described by Graham and Van der Eb (1973) [28]. Each individual plate received 15 μ g of the test plasmid and 5 μ g of human growth hormone (hGH)-encoding plasmid pXGH5 [29] for 4

to 6h before being washed with PBS and incubated an additional 48h in fresh medium. Levels of CAT activity for the transfected cells were determined as described [30] and normalized to the amount of hGH secreted into the culture media and assayed using a kit for quantitative measurement of hGH (Immunocorp, Montréal, Quebec, Canada). The value presented for each individual test plasmid transfected corresponds to the mean of at least three separate transfections done with RPE cells from three different donors, each in triplicate. To be considered significant, each individual value needed to be at least three times over the background level. Standard deviation is also provided for each transfected CAT plasmid. Statistical analysis was performed using a single factor ANOVA (Excel, Microsoft). A p value of less than 0.001 was considered statistically significant.

3.5 RESULTS

3.5.1 The $\alpha 5$ integrin subunit is expressed on RPE cells in situ

Integrin $\alpha 5$ subunit expression in situ on normal RPE cells has been studied previously with contradictory results. Indeed, the lack of $\alpha 5$ subunit has been reported in situ on human [19] and chicken RPE cells [31]. On the other hand, Anderson et al. [32] demonstrated its presence on monkey RPE cells. To verify if the $\alpha 5$ integrin subunit is indeed expressed in vivo on RPE cells, a 21 years-old human donor eye was analyzed by immunohistochemistry using a monoclonal antibody directed against the $\alpha 5$ subunit (Figure 3.1). As revealed on Figure 3.1A, expression of $\alpha 5$ was readily detected in the RPE monolayer, and staining was primarily concentrated along the basal surface of the cells. Staining for the integrin $\alpha 5$ subunit was also detected in the choroid. The labeling pattern for the 81 years-old retina was the same, but with much more lipofuscin autofluorescence (data not shown).

3.5.2 Proliferating and quiescent RPE cells in vitro

To assess whether cultured RPE cells grown at the cell densities selected for this study were in a quiescent or actively proliferating state, incorporation of BrdU was performed. RPE cell cultures that are left confluent for 2 days (confluent cells) incorporated BrdU into their nuclei indicating their high proliferative activity (Figure 3.2A). On the other hand, RPE cell cultures that remained confluent for 2 weeks (post-confluent cells) previous to BrdU labeling showed a markedly reduced BrdU staining indicating that most cells at this stage are out of the cell cycle and have reached cellular quiescence (Figure 3.2B). These results are consistent with the study of Kaida et al. [33] who also demonstrated that RPE cells were proliferating when cells were left for 2 to 3 days at confluence, and that proliferation of RPE cells was infrequent when cells were maintained at confluence for 8 weeks.

3.5.3 Decrease of the $\alpha 5$ protein at the RPE cell surface with cellular quiescence

The $\alpha 5$ integrin subunit has already been observed in vitro on RPE cells [12, 16, 32, 34-39], and some of these studies reported that the staining pattern differed depending on the culture state reached by RPE cells [32, 34, 35, 38]. Indeed, immunofluorescence studies showed that proliferating (undifferentiated) RPE cells had a heterogeneous $\alpha 5$ staining with fluorescence clusters at the cellular surface and fluorescence on the border of the cell membrane [32, 38]. When RPE cells reached confluence or remained confluent for 1 to 2 weeks, the $\alpha 5$ staining yielded a nearly continuous linear band around the cells [32, 34, 35]. We also found, through immunofluorescence analysis, that confluence alters the $\alpha 5$ staining of RPE cells (data not shown) and wished to determine whether confluence also affected $\alpha 5$ protein levels at the RPE cell surface. Cell surface levels of the $\alpha 5$ subunit was thus examined in RPE cells by immunoprecipitation of biotinylated cell surface proteins (Figure 3.3). A protein with a molecular mass

corresponding to that reported for the $\alpha 5$ integrin subunit (~140 kDa) [40, 41] was observed upon immunoprecipitation with a monoclonal antibody raised against the $\alpha 5$ subunit. A smaller band at ~120 kDa that corresponds to the co-precipitated integrin $\beta 1$ subunit [40, 41] was also observed (Figure 3.3). Figure 3.3 also shows that non-confluent and confluent RPE cells express similar amounts of the biotinylated $\alpha 5$ subunit at the cell surface for the same number of cells. In contrast, post-confluent cells exhibited a marked decrease in cell surface expression of $\alpha 5$ when compared to proliferating cells.

3.5.4 Transcription of the $\alpha 5$ gene varies with increasing cell confluence

To investigate whether the difference in the expression of the $\alpha 5$ subunit protein at the RPE cell surface is the consequence of a reduced transcription of the $\alpha 5$ subunit gene, total RNA from cultured RPE cells was isolated and semi-quantitative RT-PCR was performed to evaluate the amount of $\alpha 5$ mRNA transcript present at different stages of cell confluence. When normalized to the amount of transcripts encoded by the ribosomal 18S gene, both non-confluent and confluent RPE cells expressed similar levels of $\alpha 5$ transcripts whereas post-confluent cells yielded a 41% decrease in $\alpha 5$ mRNA (Figure 3.4).

Given that the levels of integrin $\alpha 5$ subunit mRNA was influenced by cell confluence, we next asked whether this was due to differences in the transcriptional activity normally driven by the $\alpha 5$ gene promoter. The identification of the regions that are important for the regulation of the $\alpha 5$ promoter was examined by comparing the activity directed by different $\alpha 5$ promoter-bearing recombinant constructs following their transient transfections into cultured RPE cells grown at different cell confluences. The recombinant constructs selected for these assays contained the CAT reporter gene fused to different lengths from the human $\alpha 5$ gene promoter that extend to 5' positions -954 bp (in plasmid -954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS), -178 bp (in plasmid -178 $\alpha 5$ CAT Δ MCS),

-132 bp (in plasmid -132 α 5CAT Δ MCS), -92 bp (in plasmid -92 α 5CAT Δ MCS) and -41 bp (in plasmid -41 α 5CAT Δ MCS) relative to the α 5 mRNA start site. As indicated in Figure 3.5, no significant CAT activity was obtained for plasmid -41 α 5CAT Δ MCS under any of the cell culture conditions selected. Extending further the α 5 promoter up to position -92 resulted in a dramatic increase in CAT activity (232-fold, 255-fold and 51-fold increase for sub-confluent, confluent and post-confluent cells, respectively) that reached maximal level of activity at confluence and then slightly decreased when RPE cells reached post-confluence. These results clearly suggested the presence of one (or a few) strong positive regulatory element(s) on the α 5 promoter segment is comprised between positions -41 to -92. Extending the α 5 promoter from -92 to -132 and -178 resulted in a marked decrease in promoter activity (3-fold, 3-fold and 7-fold decrease between -92 and -178 for sub-confluent, confluent and post-confluent cells, respectively), suggesting that negative regulatory elements functional in RPE cells are located between these positions. Further extension up to position -954 resulted in no statistically significant alteration in the α 5 promoter activity relative to the level directed by the -178 α 5CAT Δ MCS plasmid (2.0-fold, 1.3-fold and 1.6-fold increase for sub-confluent, confluent and post-confluent cells, respectively).

Figure 3.5 also shows that all of the α 5 promoter constructs used in this study directed maximal transcriptional activity at confluence, which then considerably decreased when RPE cells became quiescent (post-confluence), especially for the -132 α 5CAT Δ MCS, -178 α 5CAT Δ MCS and -954 α 5CAT Δ MCS plasmids. The -92 α 5CAT Δ MCS, -132 α 5CAT Δ MCS, -178 α 5CAT Δ MCS and -954 α 5CAT Δ MCS plasmids yielded 1.3-fold, 1.4-fold, 1.5-fold and 1.0-fold increases, in CAT activity, respectively, between sub-confluent and confluent cells, although this increase was not found to be statistically significant, except for the -132 α 5CAT Δ MCS plasmid ($p=0.0005$). All but one construct (the -92 α 5CAT Δ MCS) were found to have a statistically significant decrease

between confluent and post-confluent cells. This reduction between confluent and post-confluent cells was 1.3-fold ($p=0.02$), 1.9-fold ($p=0.0001$), 3.3-fold ($p=0.0003$) and 2.6-fold ($p=1.5 \times 10^{-8}$) for the -92 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -132 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -178 $\alpha 5$ CAT Δ MCS and -954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS plasmids, respectively. We therefore conclude that $\alpha 5$ promoter sequences that determine basal promoter activity are located between $\alpha 5$ positions -41 to -92, and that cell quiescence does affect $\alpha 5$ promoter function in vitro.

3.6 DISCUSSION

PVR is a disease in which normally quiescent RPE cells start to dedifferentiate, detach from their basement membrane and resume growth [20-22]. They migrate, proliferate and secrete ECM molecules that form fibrocellular membranes on the retina or in the vitreous [20-22]. As the disease progresses, the membranes contract and cause tractional retinal detachment [20-22]. Migration, proliferation and dedifferentiation of RPE cells should involve membrane proteins like integrins since they have been shown to play a predominant role in such processes [7, 8]. Moreover since FN was clearly shown to be present in epiretinal membranes in PVR [42-44], it has been postulated that its membrane receptor, the integrin $\alpha 5\beta 1$, could be involved in PVR [45]. We therefore used cultures of RPE cells as a model for dedifferentiated cells that are actively proliferating and studied the expression of the $\alpha 5$ integrin subunit at the protein, mRNA and gene levels.

In order to establish if the integrin $\alpha 5$ subunit is differently regulated on recently dedifferentiated RPE cells that are actively proliferating, we first needed to establish whether this subunit is normally expressed in vivo. We found that the integrin $\alpha 5$ subunit is indeed expressed on human RPE cells in situ. This contrasts with the data of Brem et al. [19] who found no $\alpha 5$ in human RPE cells. The presence of $\alpha 5$ on RPE cells in vitro is less unsettled, and its presence has been well documented [12, 16, 32, 34-39]. Indeed, indirect evidence that RPE

cells do express the $\alpha 5$ integrin subunit has been provided in a recent study by Zhao et al. [39]. They demonstrated that phagocytosis of FN-coated beads by human RPE cells was markedly inhibited by exposure of such cells to antibodies directed against the $\alpha 5$ integrin subunit. Direct evidence that human RPE cells do indeed express the $\alpha 5$ integrin subunit was also provided by the same group through both FACS and RT-PCR analyses [16]. In that study, $\alpha 5$ integrin subunit expression was shown to be substantially increased through the activation of the MAPK signaling pathway upon exposure of RPE cells to TNF- α [16]. Although these studies provided evidence that the $\alpha 5$ integrin subunit is expressed in RPE cells, none examined whether cell confluence has any influence on this integrin subunit expression and whether such alterations also translate into altered $\alpha 5$ promoter function as well.

It has been shown that RPE cells in culture demonstrate different patterns of expression for the same protein depending on how much time cells are left at confluence [35]. For example, adhesion molecules of the integrin and CAM families showed a similar diffuse distribution of varying intensity among individual cells early in confluence, then each accumulated in a distinct pattern at the cell periphery when cell reached full confluence. The time required for each molecule to achieve its characteristic distribution differed, ranging from 1-2 weeks post-confluence for the integrin $\alpha 5\beta 1$, 5 weeks post-confluence for ICAM and PECAM, and 2 months post-confluence for N-cadherin and NCAM [35]. Our immunofluorescence data (not shown) are consistent with these results. However immunofluorescence does not provide quantitative information on the amount of protein expressed at the cell surface. We thus evaluated if this differing pattern of expression was reflected with a change in the amount of protein at the cell surface. In our experiments with cultured RPE cells, immunoprecipitation studies showed that proliferating cells express much more $\alpha 5$ at the cell surface than quiescent cells. Thus, unlike proliferating cells, quiescent cells may need different integrins at their cell surface and the presence of $\alpha 5\beta 1$ may not be required in large amount. This is in accordance

with other studies [41, 47-49] which demonstrated that terminal differentiation of keratinocytes in culture also involves loss of $\alpha 5\beta 1$ at the cell surface. Also, Sastry et al. [50] demonstrated that $\alpha 5$ -transfected myoblasts remained in the proliferative phase and that differentiation was inhibited even in confluent cultures, suggesting that loss of integrin $\alpha 5$ expression may be required in order for differentiation to take place.

Our results provided evidence that cell quiescence also affected expression of integrin $\alpha 5$ subunit at the gene level. Both mRNA levels and promoter strength decreased between confluent and post-confluent cells. This indicates that promoter activity is at its highest when proliferating cells reach confluence and then there is a general down regulation of the $\alpha 5$ promoter when cells become quiescent. These results are consistent with those from other studies [49, 51]. Indeed, the reduced transcription of integrin $\alpha 5$ subunit in keratinocytes has been shown to correlate with the expression of differentiation markers [49]. In addition, when human fibrosarcoma HT-1080 cells are released from quiescence, an increase in promoter activity, mRNA level as well as protein levels has been observed for the integrin $\alpha 5$ subunit [51]. In a more recent study conducted by our group, expression directed by the human $\alpha 5$ integrin subunit gene promoter was found to be strongly affected by cell density in primary cultures of rabbit corneal epithelial cells (RCECs) [52]. Indeed, the $\alpha 5$ promoter activity was found to be 9 to 13 times lower in confluent RCECs when compared to the level measured in non-confluent cells, indicating that the $\alpha 5$ promoter is regulated differently in different cell types. It must be pointed out that RCECs reach quiescence after only a few days at post-confluence.

When we look more closely at the regulation of the $\alpha 5$ promoter in RPE cells, we found that the sequence located between positions -41 to -92 functions as a powerful transcriptional activator. Previous studies demonstrated that the -62 to -132 $\alpha 5$ promoter region indeed functions as a positive regulatory region in

the fibrosarcoma HT-1080 cell line [51]. The -41 to -92 $\alpha 5$ promoter segment was also shown to positively modulate $\alpha 5$ promoter activity in the promonocytic U937 cell line [53]. The $\alpha 5$ -41/-92 promoter sequence bears target sequences for the transcription factors AP-1 (between positions -45 and -51 bp) [51] and Sp1 (between positions -61 and -77 bp) [46]. Sp1 has recently been shown to bind a target site within this $\alpha 5$ promoter segment designated the fibronectin responsive element (FRE) and located between positions -56 to -82, which confers responsiveness of the $\alpha 5$ promoter toward FN [46]. Whether AP-1 or Sp1 are involved in the -41/-92 mediated up regulation of the $\alpha 5$ promoter activity in RPE cells remains to be elucidated.

The present study shows that when RPE cells are dedifferentiated and proliferate, promoter activity, mRNA transcripts and $\alpha 5$ protein levels are highly increased compared to quiescent cells. This finding is important in view of the possible involvement of this integrin subunit in PVR. Indeed, given that FN was shown to be expressed in epiretinal membranes in PVR [42-44], that the $\alpha 5\beta 1$ integrin binds specifically to FN [7-9] and that $\alpha 5\beta 1$ promotes cell proliferation and migration [14, 16], it can be postulated that the $\alpha 5$ integrin subunit plays a major role in PVR in which RPE cells detach from the underlying Bruch's membrane, migrate and proliferate [20-22]. This integrin subunit could thus represent a therapeutic target for PVR if the mechanism of its upregulation can be identified. In this regard, a recent study [36] demonstrated that human RPE cells grown in the presence of vitreous resulted in an elevation of expression of the $\alpha 5$ subunit. In PVR, RPE cells come in contact with vitreous through a tear in the neural retina [55]. Therefore, a detailed study on how the transcriptional activity directed by the $\alpha 5$ promoter is modulated following exposure of RPE cells to the vitreous would most certainly contribute to the understanding of why this integrin subunit is upregulated during PVR.

3.7 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the National Eyebank inc. (Quebec, Canada) for providing us with human globes. We wish to thank Dr. Bruce A. Pfeffer (from Bausch & Lomb, Rochester, New York) for his help in starting RPE cell cultures. We are also grateful for the technical assistance of Marcelle Giasson and Steeve Leclerc (both from the CHUL Research Center) in cell cultures, transient transfections and RT-PCR. Supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). SP held a scholarship from the NSERC and was supported by a joint scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the E.A. Baker Foundation from the Canadian National Institute for the Blind (CNIB). CS and SLG are Chercheur Boursier National from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

3.8 REFERENCES

1. Marmor MF. Structure, function and disease of the retinal pigment epithelium. In: Marmor MF and Wolfensberger TJ, eds. *The Retinal Pigment Epithelium*. Vol Oxford: Oxford University Press; 1998. p. 3-9.
2. Campochiaro PA, Jerdan JA and Glaser BM. The Extracellular Matrix of Human Retinal Pigment Epithelial Cells In Vivo and its Synthesis In Vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27:1615-21.
3. Dutt K, Scott MM, Del Monte M, Brennan M, Harris-Hooker S, Kaplan HJ, et al. Extracellular matrix mediated growth and differentiation in human pigment epithelial cell line 0041. *Curr Eye Res* 1991; 10:1089-100.

4. Campochiaro PA and Hackett SF. Corneal Endothelial Cell Matrix Promotes Expression of Differentiated Features of Retinal Pigmented Epithelial Cells: Implication of Laminin and Basic Fibroblast Growth Factor as Active Components. *Exp Eye Res* 1993; 57:539-47.
5. Miceli MV and Newsome DA. Effects of extracellular matrix and Bruch's membrane on retinal outer segment phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium. *Curr Eye Res* 1996; 15:17-26.
6. Ho T-C, Del Priore L and Kaplan HJ. En bloc transfer of extracellular matrix *in vitro*. *Curr Eye Res* 1996; 15:991-97.
7. Elnér SG and Elnér VM. The integrin superfamily and the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:696-701.
8. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.
9. Aota S and Yamada KM. Fibronectin and cell adhesion: specificity of integrin-ligand interaction. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1995; 70:1-21.
10. Yin Z, Gabriele E, Leprini A, Perris R and Colombatti A. Differential cation regulation of the alpha 5 beta 1 integrin-mediated adhesion of leukemic cells to the central cell-binding domain of fibronectin. *Cell Growth Differ* 1997; 8:1339-47.
11. Nista A, Leonetti C, Bernardini G, Mattioni M and Santoni A. Functional role of alpha4beta1 and alpha5beta1 integrin fibronectin receptors expressed on adriamycin-resistant MCF-7 human mammary carcinoma cells. *Int J Cancer* 1997; 72:133-41.

12. Kim KS, Tezel TH and Del Priore LV. The reattachment of adult human retinal pigment epithelium (RPE) to extracellular matrix (ECM) is mediated mainly by beta1 integrin subunit [ARVO Abstract]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39:S98.
13. Davey G, Buzzai M and Assoian RK. Reduced expression of (alpha)5(beta)1 integrin prevents spreading- dependent cell proliferation. J Cell Sci 1999; 112:4663-72.
14. Chon JH, Netzel R, Rock BM and Chaikof EL. Alpha4beta1 and alpha5beta1 control cell migration on fibronectin by differentially regulating cell speed and motile cell phenotype. Ann Biomed Eng 1998; 26:1091-101.
15. Hakkinen L, Heino J, Koivisto L and Larjava H. Altered interaction of human granulation-tissue fibroblasts with fibronectin is regulated by alpha 5 beta 1 integrin. Biochim Biophys Acta 1994; 1224:33-42.
16. Jin M, He S, Worpel V, Ryan SJ and Hinton DR. Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41:4324-32.
17. Beliveau A, Berube M, Rousseau A, Pelletier G and Guerin SL. Expression of integrin alpha5beta1 and MMPs associated with epithelioid morphology and malignancy of uveal melanoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41:2363-72.
18. Robbins SG, Brem RB, Wilson DJ, O'Rourke LM, Robertson JE, Westra I, et al. Immunolocalization of integrins in proliferative retinal membranes. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35:3475-85.

19. Brem RB, Robbins SG, Wilson DJ, O'Rourke LM, Mixon RN, Robertson JE, et al. Immunolocalization of integrins in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:3466-74.
20. Kirchhof B and Sorgente N. Pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. Modulation of retinal pigment epithelial cell functions by vitreous and macrophages. *Dev Ophthalmol* 1989; 16:1-53.
21. Nagasaki H, Shinagawa K and Mochizuki M. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog Retin Eye Res* 1998; 17:77-98.
22. Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview. *Surv Ophthalmol* 1998; 43:3-18.
23. Pfeffer BA. Improved Methodology for Cell Culture of Human and Monkey Retinal Pigment Epithelium. In: Osborne N and Chader J, eds. *Progress in retinal Research*. Vol 10. Oxford: Pergamon Press; 1991. p. 251-91.
24. Guntern R, Vallet PG, Bouras C and Constantinidis J. An improved immunohistostaining procedure for peptides in human brain. *Experientia* 1989; 45:159-61.
25. Feeney L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17:583-600.
26. Kennedy BG, Haley BE and Mangini NJ. Creatine kinase in human retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 2000; 70:183-90.

27. Beliveau A, Leclerc S, Rouleau M and Guerin SL. Multiple cloning sites from mammalian expression vectors interfere with gene promoter studies in vitro. *Eur J Biochem* 1999; 261:585-90.
28. Graham FL and van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973; 52:456-67.
29. Selden RF, Howie KB, Rowe ME, Goodman HM and Moore DD. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol Cell Biol* 1986; 6:3173-9.
30. Pothier F, Ouellet M, Julien JP and Guerin SL. An improved CAT assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells. *DNA Cell Biol* 1992; 11:83-90.
31. Rizzolo LJ, Zhou S and Li ZQ. The neural retina maintains integrins in the apical membrane of the RPE early in development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:2567-76.
32. Anderson DH, Guerin CJ, Matsumoto B and Pfeffer BA. Identification and localization of a beta-1 receptor from the integrin family in mammalian retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:81-93.
33. Kaida M, Cao F, Skumatz CM, Irving PE and Burke JM. Time at confluence for human RPE cells: effects on the adherens junction and in vitro wound closure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3215-24.
34. Hunt RC, Pakalnis VA, Choudhury P and Black EP. Cytokines and serum cause alpha 2 beta 1 integrin-mediated contraction of collagen gels by cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:955-63.

35. McKay BS, Irving PE, Skumatz CM and Burke JM. Cell-cell adhesion molecules and the development of an epithelial phenotype in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 1997; 65:661-71.
36. Meitinger D, Hunt DM, Shih DT, Fox JC and Hunt RC. Vitreous-induced modulation of integrins in retinal pigment epithelial cells: effects of fibroblast growth factor-2. *Exp Eye Res* 2001; 73:681-92.
37. Mousa SA, Lorelli W and Campochiaro PA. Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Biochem* 1999; 74:135-43.
38. Yang CH, Huang TF, Liu KR, Chen MS and Hung PT. Inhibition of retinal pigment epithelial cell-induced tractional retinal detachment by disintegrins, a group of Arg-Gly-Asp-containing peptides from viper venom. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:843-54.
39. Zhao MW, Jin ML, He S, Spee C, Ryan SJ and Hinton DR. A distinct integrin-mediated phagocytic pathway for extracellular matrix remodeling by RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2713-23.
40. Akiyama SK and Yamada KM. Biosynthesis and acquisition of biological activity of the fibronectin receptor. *J Biol Chem* 1987; 262:17536-42.
41. Hotchin NA and Watt FM. Transcriptional and post-translational regulation of beta 1 integrin expression during keratinocyte terminal differentiation. *J Biol Chem* 1992; 267:14852-8.
42. Immonen I, Tervo K, Virtanen I, Laatikainen L and Tervo T. Immunohistochemical demonstration of cellular fibronectin and tenascin in human epiretinal membranes. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1991; 69:466-71.

43. Sramek SJ, Wallow IH, Stevens TS and Nork TM. Immunostaining of preretinal membranes for actin, fibronectin, and glial fibrillary acidic protein. *Ophthalmology* 1989; 96:835-41.
44. Yeo JH, Sadeghi J, Campochiaro PA, Green WR and Glaser BM. Intravitreal fibronectin and platelet-derived growth factor. New model for traction retinal detachment. *Arch Ophthalmol* 1986; 104:417-21.
45. Goldschild M and Baudouin C. [Role of integrins in ocular physiology and diseases]. *J Fr Ophtalmol* 1997; 20:311-25.
46. Larouche K, Leclerc S, Salesse C and Guerin SL. Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro. *J Biol Chem* 2000; 275:39182-92.
47. Adams JC and Watt FM. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. *Cell* 1990; 63:425-35.
48. Adams JC and Watt FM. Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes. *J Cell Biol* 1991; 115:829-41.
49. Nicholson LJ and Watt FM. Decreased expression of fibronectin and the alpha 5 beta 1 integrin during terminal differentiation of human keratinocytes. *J Cell Sci* 1991; 98:225-32.

50. Sastry SK, Lakonishok M, Thomas DA, Muschler J and Horwitz AF. Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation. *J Cell Biol* 1996; 133:169-84.
51. Wang D, Birkenmeier TM, Yang J, Venkateswarlu S, Humphrey L, Brattain MG, et al. Release from quiescence stimulates the expression of integrin alpha 5 beta 1 which regulates DNA synthesis in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J Cell Physiol* 1995; 164:499-508.
52. Gingras, M-E, K Larouche, N Larouche, S Coulombe, S Leclerc C Salesse, and SL Guérin. Expression of the gene encoding integrin subunit $\alpha 5$ is positively regulated by the transcription factors Sp1/Sp3 during wound healing of rabbit corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 2003 (in press).
53. Birkenmeier TM, McQuillan JJ, Boedeker ED, Argraves WS, Ruoslahti E and Dean DC. The alpha 5 beta 1 fibronectin receptor. Characterization of the alpha 5 gene promoter. *J Biol Chem* 1991; 266:20544-9.
54. Boles BK, Ritzenthaler J, Birkenmeier T and Roman J. Phorbol ester-induced U-937 differentiation: effects on integrin alpha(5) gene transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278:L703-12.
55. Glaser BM and Lemor M. Pathobiology of proliferative vitreoretinopathy. In: Ryan SJ, ed. *Retina*. St. Louis, MO, USA: Mosby; 1994. p. 2249-63.

3.9 FIGURES

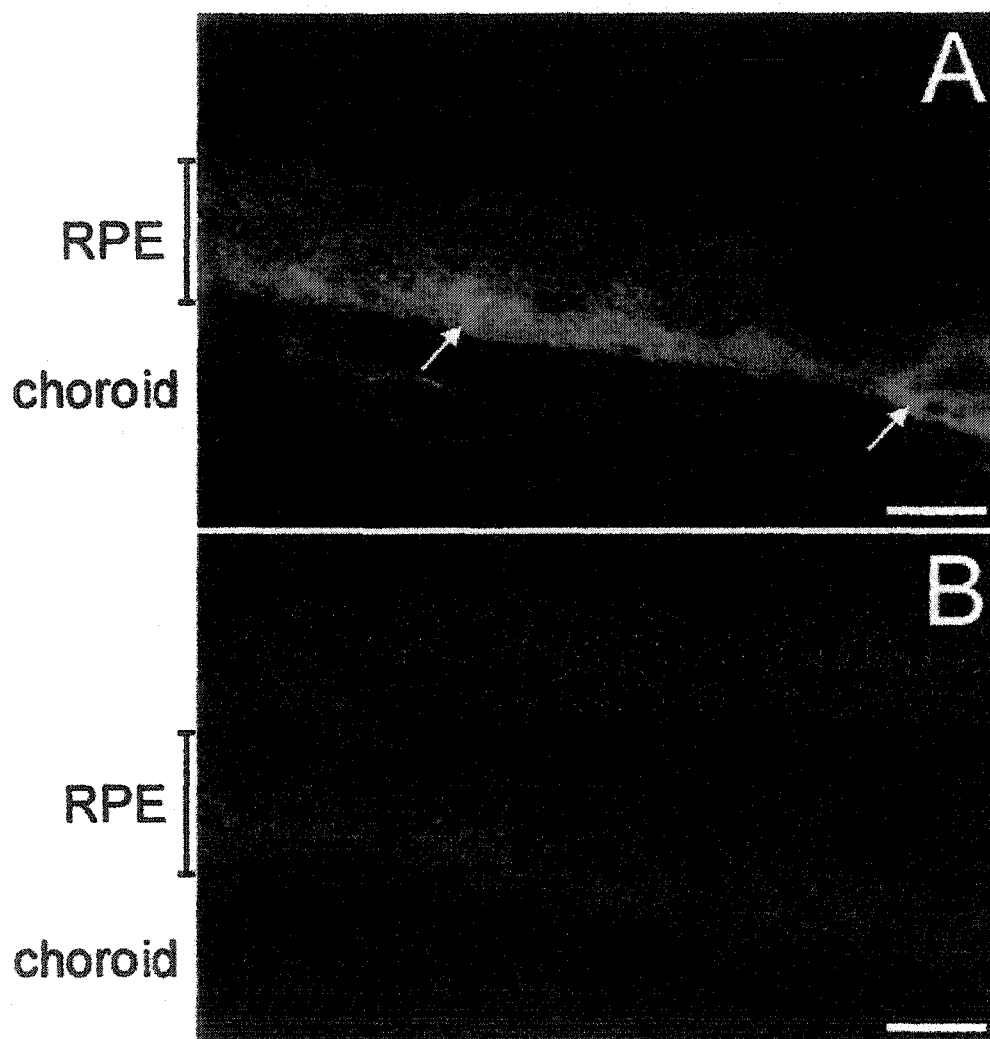


Figure 3.1: Immunofluorescent detection of integrin $\alpha 5$ in situ. Figure shows cryosections of a retina of a 21 years-old donor. As described in methods, specific immunoreactivity appears green and lipofuscin autofluorescence appears orange/yellow. A) Integrin $\alpha 5$ subunit is detected diffusely throughout the cell surface, and more intense staining is found at the basal surface of the RPE monolayer (arrows). The retina peeled off during cryosection processing. B) Negative control using normal rabbit serum. Scale bar represents 10 μm .

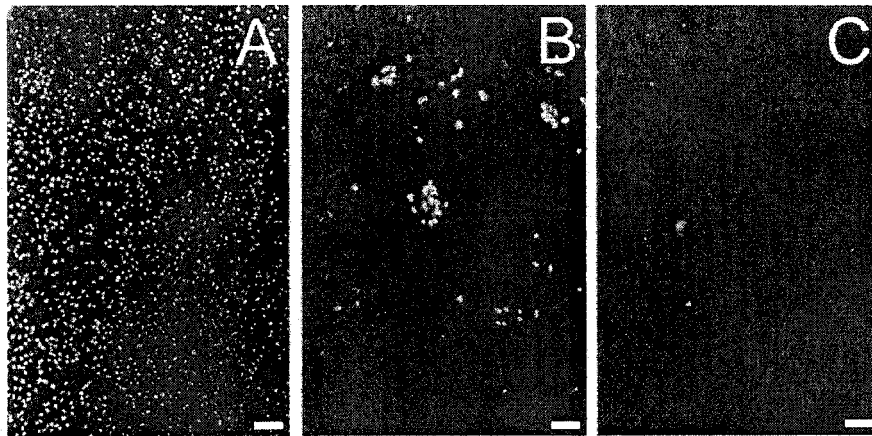


Figure 3.2: Proliferation assay
Primary human RPE cells were seeded at 1.5×10^5 cells/cm² and remained in culture for either 2 days (confluent cells) (A) or 2 weeks (post-confluent cells) (B) before BrdU labeling (see methods). For negative controls, the primary antibody was omitted (C). Scale bar represents 100 μ m.

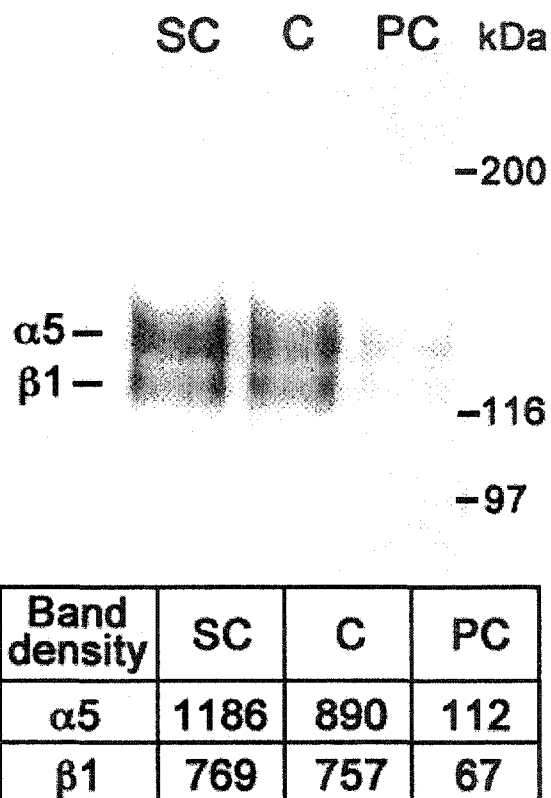


Figure 3.3 Immunoprecipitation of biotinylated cell surface proteins with anti integrin $\alpha 5$ antibody
Upper panel. Sub-confluent (sc), confluent (c) and post-confluent (pc) primary human RPE cells were harvested, labeled with soluble sulfo-NHS-LC-Biotin and immunoprecipitated with anti-integrin $\alpha 5$ antibody under denaturing conditions. *Lower panel.* Band density was calculated by the QuantityOne Image analysis software (see methods).

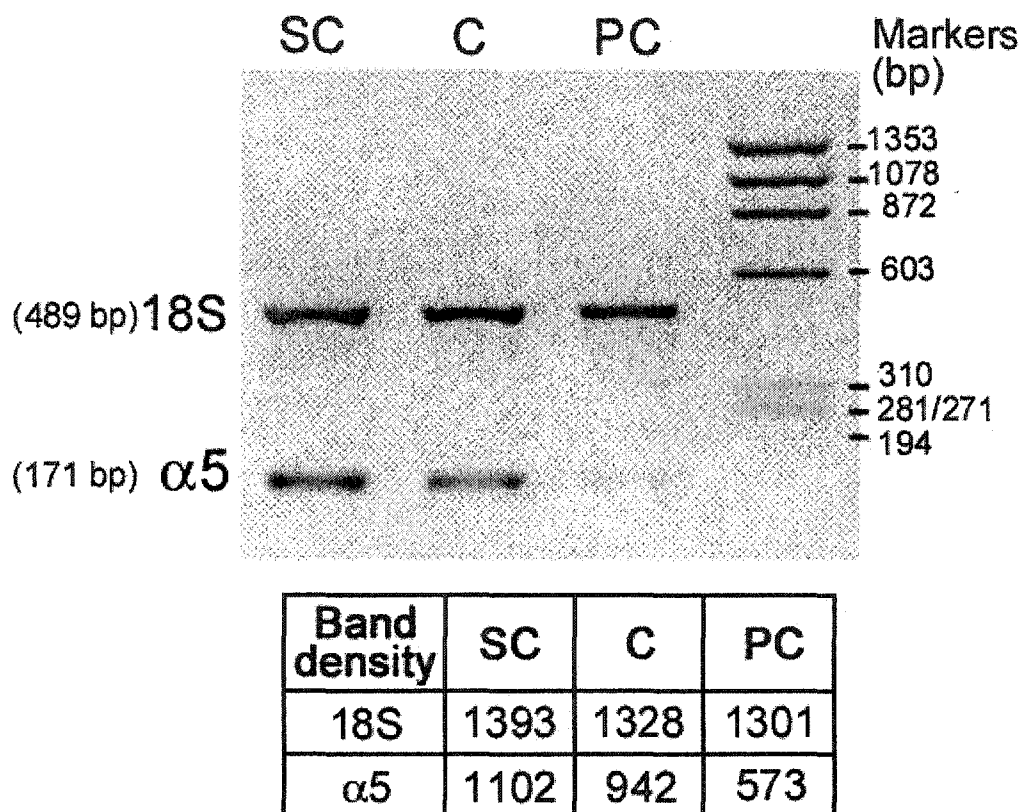


Figure 3.4: RT-PCR amplification of integrin $\alpha 5$ mRNAs

Upper panel. Integrin $\alpha 5$ amplification products were obtained from sub-confluent (sc), confluent (c) and post-confluent (pc) primary cultures of human RPE cells and normalized to the 18S PCR product for semi quantitative evaluation. The position of the integrin $\alpha 5$ (171 bp) and 18S (489 bp) amplification products are shown, along with that of the most representative DNA markers. *Lower panel.* Band was density calculated by the QuantityOne Image analysis software (see methods).

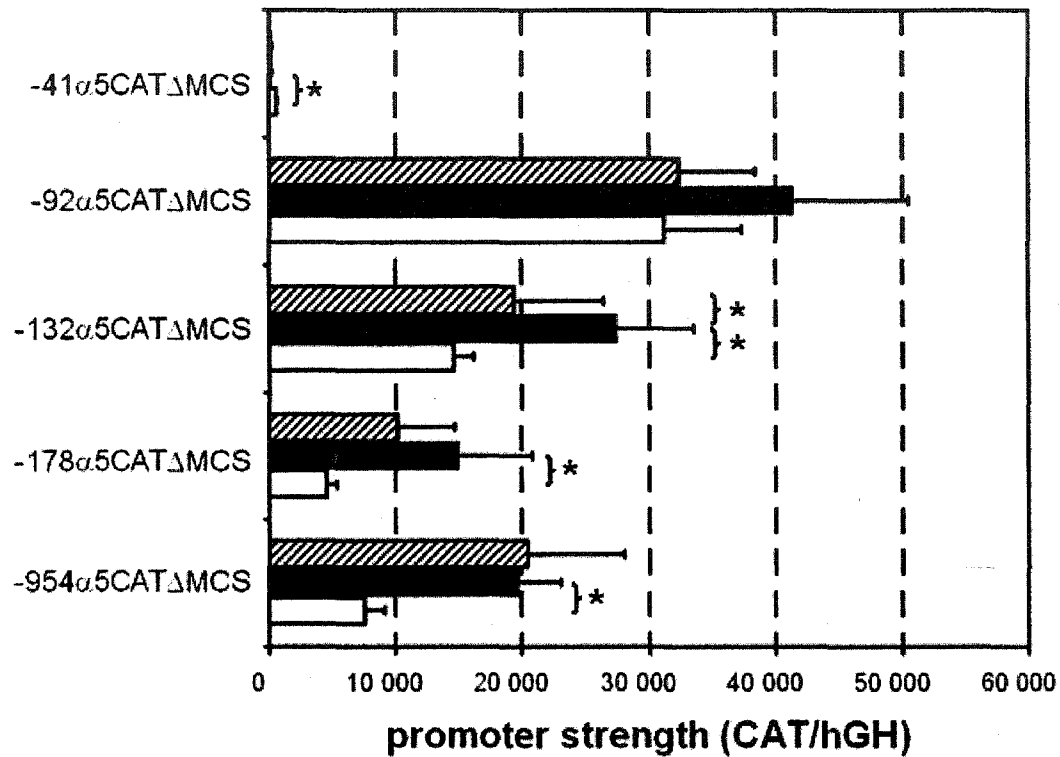


Figure 3.5 Cell density dependence of the α 5 promoter activity in RPE cells.

Sub-confluent (dashed box) ($n = 24$), confluent (filled box) ($n = 30$) and post confluent (white box) ($n = 9$) cultures of human RPE cells were transiently transfected with recombinant plasmids bearing the CAT reporter gene fused to various promoter segments from the human α 5 gene. Levels of CAT activity for the transfected cells were normalized to the amount of hGH secreted into the culture media. Values are presented with standard deviation. An asterisk at the right side of the boxes indicates a promoter strength statistically different between the sub-confluent and confluent cells, or between the confluent and post-confluent cells, as indicated by the brackets (ANOVA; $p < 0.001$). See text for individual p values.

CHAPITRE 4

INTEGRIN $\alpha 5$ EXPRESSION IN THE ARPE-19 CELL LINE: COMPARISON WITH PRIMARY RPE CULTURES AND EFFECT OF GROWTH MEDIUM ON THE $\alpha 5$ GENE PROMOTER STRENGTH

Article publié dans la revue

Experimental Eye Research (2004) 79: 157-65

Integrin $\alpha 5$ expression in the ARPE-19 cell line: comparison with primary RPE cultures and effect of growth medium on the $\alpha 5$ gene promoter strength

Stéphanie Proulx^{1,3}, Solange Landreville^{1,3}, Sylvain L. Guérin² and Christian Salesse^{1,3,*}

¹Université du Québec à Trois-Rivières, Dept. Chimie-Biologie, Trois-Rivières, Québec, Canada, ²Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada, ³Unité de Recherche en Ophtalmologie, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval, Ste-Foy, Quebec, Canada

*To whom correspondance should be adressed : Unité de Recherche en Ophtalmologie, Centre de Recherche du CHUL, Pavillon CHUL, 2705 Boul. Laurier, Ste-Foy, Quebec, Canada, G1V 4G2, phone: (418) 656-4141 ext 7243, fax: (418) 654-2131, e-mail: christian.salesse@crchul.ulaval.ca

Short title: Integrin $\alpha 5$ expression in ARPE-19 cells

Keywords: ARPE-19, RPE, primary cultures, integrin $\alpha 5$, protein expression, promoter, growth medium

4.1 RÉSUMÉ

Les cultures primaires d'EPR humain requièrent de jeunes donneurs avec un délai post-mortem court et n'ayant pas de maladie rétinienne connue. L'utilisation d'une lignée cellulaire établie, comme la lignée ARPE-19, pourrait représenter une alternative intéressante afin de remplacer les cultures primaires. Cette lignée cellulaire possède plusieurs caractéristiques des cellules de l'EPR, incluant la morphologie cellulaire, des jonctions étanches fonctionnelles, et l'expression des marqueurs CRALBP et RPE65. Nous avons donc évalué l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, à la fois au niveau du gène et de la protéine, et comparé ces résultats avec ceux obtenus en utilisant des cultures primaires d'EPR dont les résultats ont été publiés précédemment (Proulx, Guérin et Salesse, 2003). La présence de la protéine $\alpha 5\beta 1$ a été évaluée sur des cultures d'EPR de différentes confluences par des analyses d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation. Les niveaux du transcrit $\alpha 5$ ont été évalués par RT-PCR semi-quantitatif. Des transfections transitoires ont aussi été réalisées afin de comparer l'activité du promoteur $\alpha 5$ dans les deux types de cellules. Les résultats d'immunofluorescence ont démontré un marquage similaire pour chacune des confluences étudiées entre les cellules en cultures primaires et celles de la lignée ARPE-19. Les analyses d'immunoprécipitation et de RT-PCR ont démontré des niveaux similaires de protéines et d'ARNm pour les cellules ARPE-19 non-confluentes et confluentes, et que ces niveaux diminuaient lorsque les cellules devenaient post-confluentes. L'activité dirigée par le promoteur $\alpha 5$ s'est avérée beaucoup plus puissante dans la lignée ARPE-19 que dans les cellules provenant de cultures primaires. De plus, des différences considérables ont été observées dans l'utilisation des différents éléments de régulation identifiés dans le promoteur du gène $\alpha 5$ entre les cultures primaires et les cellules ARPE-19. Cette étude démontre que les niveaux de protéines et de transcrits diminuent dans la lignée ARPE-19 lorsque les cellules deviennent post-confluentes, un comportement également observé chez les cultures primaires. Par contre, des différences majeures entre les deux types de cellules sont notées dans la force et dans les éléments du promoteur $\alpha 5$ utilisés afin d'en moduler l'expression. Cette

étude a également permis de démontrer que le milieu de culture exerce un effet non négligeable sur l'activité transcriptionnelle dirigée par le promoteur du gène $\alpha 5$.

4.2 ABSTRACT

Primary cultures of human retinal pigment epithelium (RPE) requires young human donors with short post-mortem time and no known retinal diseases. The use of an established human RPE cell line, like ARPE-19, would be a welcomed alternative to primary cultures. This cell line retains many of the characteristics of RPE cells, including cell morphology, functional tight junctions and expression of CRALBP and RPE65. This study was conducted in order to investigate integrin $\alpha 5$ expression at both the gene and protein level in the ARPE-19 cell line and compare the results with those obtained with primary cultures of RPE cells. The potential use of this cell line as a substitute for primary cultures of RPE cells was also considered. Integrin $\alpha 5$ protein was detected on RPE and ARPE-19 cultures at different confluency by immunofluorescence and immunoprecipitation analyses. Semi-quantitative RT-PCR was used to study $\alpha 5$ mRNA levels. Transient transfections were performed in order to compare $\alpha 5$ promoter strength in both types of cells. Immunofluorescence studies showed that both primary RPE and ARPE-19 cells yielded similar $\alpha 5$ staining patterns at all cell confluencies. Both immunoprecipitation and RT-PCR analyses provided evidence that sub-confluent and confluent RPE and ARPE-19 cells have similar cell surface $\alpha 5$ protein and mRNA levels whereas post-confluent cells had a marked decrease in both protein and transcript levels. ARPE-19 cells show a large increase in promoter strength compared to primary cultures. When compared to primary cultures, the cell line exhibited major differences in the way the $\alpha 5$ promoter is regulated, even if both cell types are cultured under identical conditions. This study demonstrates that primary cultures of human RPE and ARPE-19 cells show reductions in both the $\alpha 5$ protein and the mRNA when cells reach post-confluency. However, major differences have been observed in the strength of the $\alpha 5$ promoter between both cell types. We also show that culturing ARPE-19 cells in a different growth medium alters the transcriptional activity directed by the $\alpha 5$ promoter.

4.3 INTRODUCTION

Retinal pigment epithelial (RPE) cells account for a number of vital functions required for the maintenance of retinal integrity, such as the adhesion of the retina. A lack of adhesion between RPE cells and the Bruch's membrane has well-characterized pathologic consequences. For example, a breakdown in adhesion between the photoreceptor cell layer of the neural retina and the RPE eventually leads to photoreceptor degeneration and blindness (Fisher and Anderson, 1989). A lack of adhesion between the RPE and the choroid results in proliferative vitreoretinopathy (PVR) (Fisher and Anderson, 1989). In PVR, RPE cells act in a wound healing fashion (Baudouin and Gastaud, 1994; Glaser and Lemor, 1994; Ryan, 1993; Weller, Wiedemann and Heimann, 1990). Indeed, these normally quiescent and differentiated cells detach from the underlying Bruch's membrane, migrate and proliferate. Then they secrete extracellular matrix (ECM) molecules and form an epiretinal membrane that leads to retinal detachment.

Integrins have been postulated to play a major role in PVR (Robbins et al., 1994). They are a class of heterodimeric membrane proteins that are essential in numerous cellular processes involving cell-ECM or cell-cell interactions. Integrins are heterodimers consisting of variable α and β subunits and combination of which determines the receptor specificity for the different ECM molecules (Elnar and Elnar, 1996; Hynes, 1992). Signals transduced by integrins can influence cell adhesion, migration, differentiation and proliferation (Elnar and Elnar, 1996; Hynes, 1992). For example, expression of the $\alpha 5 \beta 1$ integrin has been found to be upregulated when human fibrosarcoma HT1080 cells are released from quiescence (Wang et al., 1995).

Culturing human RPE cells is now a well established procedure (Burke et al., 1996; McKay and Burke, 1994; Pfeffer, 1991; Tezel, Del Priore and Kaplan, 1997) and many have used primary human RPE cell cultures for integrin expression studies (Anderson et al., 1990; Hunt et al., 1994; Jin et al., 2000; Kupper and Ferguson, 1993; Lin and Clegg, 1998; McKay et al., 1997; Meitinger et al., 2001; Miceli, Newsome and Tate, 1997;

Mousa, Lorelli and Campochiaro, 1999; Zhao et al., 1999). However, primary cultures of human RPE cells require donor eyes with short post-mortem time which limit their potential use for further studies. In addition, primary cultures of human RPE cells show phenotypic differences *in vitro* (Burke et al., 1996) and may present other physiological differences caused by donor to donor variabilities. In fact, these authors have identified 8 discrete phenotypes of RPE cells within the same cultures. Seven out of the 8 phenotypes were observed in all primary cultures derived from 38 human donors.

The ARPE-19 is a nontransformed, human RPE cell line with normal kariology (Dunn et al., 1996). ARPE-19 cells retain many of the characteristics of RPE cells, including cell morphology (Dunn et al., 1996), functional tight junctions (Dunn et al., 1996) and the ability to phagocytose rod outer segments (Finnemann et al., 1997). They also express the RPE-specific markers CRALBP and RPE65 (Dunn et al., 1996). This cell line has been previously used as an alternative to primary cultures because of its readily availability and the stability of its features in prolonged cultivation. These studies included, amongst others, changes in gene expression in response to vitreous (Fan et al., 2002), expression and promoter activation of RPE65 (Boulanger and Redmond, 2002; Nicoletti, Kawase and Thompson, 1998), studies related to oxidative stress (Alizadeh et al., 2001; Bridges et al., 2001; Gao, Dinkova-Kostova and Talalay, 2001; Sparrow et al., 2002; Wada et al., 2001; Weigel, Handa and Hjelmeland, 2002), studies concerning advanced glycation end products (Handa et al., 1998; Honda et al., 2001; Treins et al., 2001), generation of a synthetic mammalian promoter library (Tornoe et al., 2002), gene expression profile during wound repair (Singh et al., 2001) and use of ARPE-19 as a model for cell polarity (Dunn et al., 1998).

We recently reported that integrin $\alpha 5$ subunit expression varies as a consequence of increasing cell confluence in primary human RPE cells (Proulx, Guerin and Salesse, 2003). The present study was conducted to evaluate whether ARPE-19 cells possess a similar pattern of integrin $\alpha 5$ expression as that previously reported for primary cells (Proulx et al., 2003). Expression of the integrin $\alpha 5$ subunit and $\alpha 5$ promoter function were examined into both ARPE-19 and primary cultures of RPE cells grown at the same

cell densities. Our results show that both cell types express the $\alpha 5$ protein and $\alpha 5$ mRNA similarly, but major differences were observed at the level of promoter strength. This study also shows that culturing ARPE-19 cells in a different growth medium changes the promoter strength of the integrin $\alpha 5$ gene.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Cell culture

Cultures of RPE cells were established from human eyes obtained from the National Eyebank inc. (CHUL, Quebec) within 24h of death. This research was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki. Dissection was done by a modification of a previously published method (Pfeffer, 1991). The cells were cultured with Keratinocyte-SFM medium (Canadian Life Technologies, Burlington, ON) supplemented with 5% bovine calf serum (Hyclone, Logan, UTAH) and various vitamins and proteins as described in (Proulx et al., 2003). Medium was changed every 2-3 days. For all experiments, cultures were used at passage 2. ARPE-19 cells were purchased from the ATCC (CRL-2302) and grown according to the manufacturer's instruction. They were cultured in DMEM/F12 growth medium (Canadian Life Technologies, Burlington, ON) with 3mM glutamine (Sigma, Oakville, ON) and supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UTAH). Growth medium was changed every 2-3 days and cultures were used at passage 36. Both primary RPE and ARPE-19 cell cultures were plated at different cell densities as follows: sub-confluent cells: 2.5×10^4 cells/cm², 2 days in culture; confluent cells: 1.5×10^5 cells/cm², 2 days in culture; post-confluent cells: 1.5×10^5 cells/cm², 2 weeks in culture.

4.4.2 Immunofluorescence

Primary human RPE and ARPE-19 cells were plated on glass coverslips (Bellco glass, NJ) for 48h prior to fixation in cold ethanol for 10 min. The coverslips were washed in PBS and incubated at room temperature for 30 min with primary antibody

(mouse anti-human integrin $\alpha 5$, clone IIA1, Pharmingen, Mississauga, ON, Canada) at a 1:50 dilution in PBS containing 1% bovine serum albumin (PBS-BSA 1%), washed again in PBS and incubated with secondary antibody (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Molecular Probes, Eugene, OR) for 45 min in the dark at room temperature (1:200 dilution in PBS-BSA 1%). After 3 other washes in PBS and 2 final washes in distilled water, the coverslips were mounted with Prolong antifade mounting medium (Molecular Probes). Images were obtained using a MRC 1024 confocal system (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) mounted on a Nikon Diaphot TMD inverted microscope (Tokyo, Japan) equipped with 60X 1.4 N.A. immersion lens. Confocal 8 bit images were captured using Bio-Rad's Lasersharp acquisition software running under OS2. As a negative control, the primary antibody was replaced by PBS-BSA 1%. The results shown are representative of a minimum of 3 independent experiments conducted on separate RPE populations derived from different donors.

4.4.3 Immunoprecipitation

Five million RPE cells were labeled with 1ml of 1 mg/ml soluble Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL) in PBS for 60 min at room temperature. Cells were then lysed in 1ml lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 1% Igepal CA-630, 120 mM NaCl, 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1mM MgCl_2 , 0.7 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1mM pefabloc). Protein concentration was measured with the BCA method (Pierce) to ensure that equal amounts of proteins were loaded in each lane. Insoluble materials were removed by centrifugation at 16 000 g for 10 min at 4°C. Each ml of supernatant was pre-cleared by a 1h incubation with 50 μl of unconjugated protein-A-Sepharose CL-4B beads (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Quebec, Canada). Approximately 50 μl of goat anti-mouse IgG coated sepharose beads (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) was incubated for 3h at room temperature with 10 μg primary antibody (mouse anti-human integrin $\alpha 5$, clone IIA1, Pharmingen), then rinsed with wash buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5M NaCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 0.1% Tween 20) to remove unbound antibodies. Pre-cleared (500 μl) samples were precipitated for 3h at room temperature with 50 μl of protein-sepharose/anti-mouse IgG with bound primary

antibody. The Sepharose beads with bound immune complexes were washed 6 times in wash buffer. Then, 50 μ l of 2X Laemmli buffer containing 5% 2-mercaptoethanol was added to the 50 μ l of rinsed beads, boiled 5 min at 85°C, cooled, and 20 μ l was loaded per lane (corresponding to 7.5×10^5 immunoprecipitated cells) on a 6% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked for at least 1h with 3% BSA, incubated for 1h with streptavidin-HRP (Pierce), rinsed in PBS containing 0.05% Tween 20, incubated for 15 min with Supersignal (Pierce) and processed for autoradiography.

4.4.4 Semi-quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Semi-quantitative RT-PCR was performed as described by (Proulx et al., 2003). Briefly, RNA from RPE cells at different confluency was isolated using Tri-Reagent (Sigma) according to the manufacturer's instruction. Reverse transcription (RT) was performed using 5 μ g total RNA and 0.2 μ g of random hexamer primers (Fermentas; Burlington, Ontario, Canada) following the manufacturer's protocol for synthesis of first strand cDNA. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using the QuantumRNA 18S Internal standards protocol for semi-quantitative RT-PCR (Ambion, Austin, Texas) according to the manufacturer's instructions. Linear range varied between 23 and 33 cycles and the total number of cycles used for semi-quantitative RT-PCR was 28. The optimal ratio of 18S primers: competimers was determined and the ratio used was 3:7 (18S primers:competimers). The DNA sequence of the primers for amplification of the human α 5 transcript were: forward primer: 5'- G G C A G C T A T G G C G T C C C A C T G T G G -3', reverse primer: 5'- G G C A T C A G A G G T G G C T G G A G G C T T -3' (171-bp PCR product) and cycle parameters were 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec. The 18S primers (Ambion) gave a PCR product of 489 bp. Band density was evaluated by the Service d'analyse d'image du CHUL using an image analysis software (Scion).

4.4.5 Transient transfections

Plasmids containing the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene from the plasmid pSKCAT fused to various 5' deletions of the $\alpha 5$ gene and stripped of their multicloning site (MCS) (-954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -178 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -132 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -92 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -41 $\alpha 5$ CAT Δ MCS) have been previously described (Beliveau et al., 1999). RPE cells grown at different confluences were transiently transfected using the calcium phosphate precipitation method as described by Graham and Van der Eb (1973) (Graham and van der Eb, 1973). Each individual plate received 15 μ g of the test plasmid and 5 μ g of the human growth hormone (hGH)-encoding plasmid pXGH5 (Selden et al., 1986) for 4 to 6h before being washed with PBS and incubated an additional 48h in fresh medium. Levels of CAT activity for the transfected cells were determined as described (Pothier et al., 1992) and normalized to the amount of hGH secreted into the culture media and assayed using a kit for quantitative measurement of hGH (Immunocorp, Montréal, Quebec, Canada). To be considered significant, each individual value needed to be at least three times over the background level caused by the reaction buffer used. Standard deviation is also provided for each transfected CAT plasmid.

4.5 RESULTS

An antibody directed toward the integrin $\alpha 5$ subunit was used to detect the $\alpha 5$ protein on the cell surface of RPE cells. As shown in Figure 4.1, both the primary culture of human RPE cells and the ARPE-19 cell line stained positive for the integrin $\alpha 5$ protein. The fluorescence was observed at cell-cell contacts and also found diffusely throughout the cell surface for both the primary cultures and the ARPE-19 cell line.

Immunoprecipitated cell surface $\alpha 5$ integrin subunit was expressed at the same levels on sub-confluent and confluent ARPE-19 cells, whereas a marked reduction in the amount of precipitated $\alpha 5$ integrin protein was observed in post-confluent ARPE-19 cells (Fig. 4.2A). This marked reduction is apparently resulting from a decrease in $\alpha 5$ mRNA

since a reduction in the transcription directed by the $\alpha 5$ gene is also observed in post-confluent ARPE-19 cells by RT-PCR (Fig. 4.2B, upper panel). When normalized to the amount of transcripts encoded by the ribosomal 18S gene, a 30 and 20% reduction in the level of $\alpha 5$ transcripts is observed between sub-confluent and confluent RPE and ARPE-19 cells, respectively, and a 75% reduction in the levels of $\alpha 5$ transcripts between sub-confluent and post-confluent for both RPE and ARPE-19 cells (Fig. 4.2B, lower panel).

To investigate if the $\alpha 5$ promoter is regulated the same way in ARPE-19 cells as has been previously found in primary cultures of human RPE cells (Proulx et al., 2003), promoter constructs bearing the CAT reporter gene under the control of various lengths from the $\alpha 5$ promoter gene were transiently transfected into cultures of ARPE-19 cells and were compared to results previously obtained with primary human RPE cells transfected under the same conditions (Proulx et al., 2003). Upon transfection of both types of cells, the activity directed by the $\alpha 5$ promoter was found to be much higher in ARPE-19 cells than in primary cultures of RPE cells. As shown in Figure 4.3, the -178 $\alpha 5$ CAT Δ MCS plasmid encodes CAT activities more than 10 times higher in confluent ARPE-19 cells (Fig. 4.3A) than in primary RPE cells (Fig. 4.3B) at the same cell confluency.

When transfections are conducted into primary human RPE cells, no significant CAT activity was obtained for plasmid -41 $\alpha 5$ CAT Δ MCS under any of the cell culture conditions selected, and basal promoter of the $\alpha 5$ gene and maximal promoter strength is observed with the -92 $\alpha 5$ CAT Δ MCS construct (Fig. 4.3B). Promoter strength then decreased progressively upon extending further the 5' end up to position -178 (Fig. 4.3B). No significant CAT activity was obtained upon transfection of ARPE-19 cells with plasmid -41 $\alpha 5$ CAT Δ MCS and both basal activity and maximal promoter strength were also found to be determined by the -92 $\alpha 5$ CAT Δ MCS construct (Fig. 4.3A). However, and unlike primary human RPE cells, the CAT activity remains unchanged between plasmids -92 $\alpha 5$ CAT Δ MCS and -178 $\alpha 5$ CAT Δ MCS and then decreased between plasmids -

178 α 5CAT Δ MCS and -954 α 5CAT Δ MCS. These results suggest that a negative regulatory element is present on the α 5 integrin promoter between positions -178 and -954 and functional in ARPE-19 but not in primary cultures of RPE cells. As for primary cultured RPE cells, confluent ARPE-19 cells yielded the highest α 5 promoter-mediated CAT activities out of the three cell densities tested therefore suggesting that α 5 promoter activity is downregulated at both mid- and post-confluence.

We then examined whether the differences in the CAT activities directed by various α 5 promoter segments could be explained by the different growth medium used for culturing ARPE-19 cells and primary cultures of RPE cells. Transfection experiments were therefore repeated with the ARPE-19 cell line grown with the same growth medium as the one used for primary human RPE cells (Fig. 4.3C). Unlike ARPE-19 cells grown in DMEM/F12 (Fig. 4.3A), the α 5 promoter strength obtained in ARPE-19 cells grown in the Keratinocyte medium was similar to that from primary RPE cells for the constructs -41 α 5CAT Δ MCS, -92 α 5CAT Δ MCS and -132 α 5CAT Δ MCS. However, promoter strength remained higher in ARPE-19 cells for both the -178 α 5CAT Δ MCS and -954 α 5CAT Δ MCS constructs, with promoter strengths 11- and 3.5-fold higher, respectively, for the ARPE-19 cells compared to primary cultures of RPE cells. Thus, major differences at the promoter regulation level are still maintained between the two cell types grown in the same growth medium (Fig. 4.3C).

4.6 DISCUSSION

The rationale for performing this study was to evaluate whether the cell line ARPE-19 could be used for further studies on the expression of the integrin α 5 subunit as a proper model for RPE cells given that these studies will require to culture a large number of cells. This would be very difficult to achieve with primary cells given the availability of donor eyes.

Human RPE cells cultured *in vitro* have been reported to express the α 5 integrin subunit (Anderson et al., 1990; Hunt et al., 1994; Jin et al., 2000; Kim, Tezel and Del

Priore, 1998; McKay et al., 1997; Meitinger et al., 2001; Mousa et al., 1999; Yang et al., 1996; Zhao et al., 1999). Before studying the protein and gene regulation of this integrin with an established cell line, we first examined whether the presence of this integrin subunit could also be observed at the cell surface of ARPE-19 cells, a nontransformed human RPE cell line, and if the pattern of its expression resembles that found in primary cultures of RPE cells. Both types of cells expressed $\alpha 5$ integrin subunit at their cell surface, and their staining pattern was similar. As previously reported, sub-confluent and confluent RPE cells from primary cultures show similar levels of $\alpha 5$ cell surface protein and $\alpha 5$ mRNA (Fig. 4.2A and 4.2B) and both are markedly reduced when cultures reach post-confluency (Proulx et al., 2003). The present study showed that similar results are also obtained with the ARPE-19 cell line. However, when transfecting primary human RPE cells and ARPE-19 cells at the same confluency, major differences in both the $\alpha 5$ promoter strength and the $\alpha 5$ regulatory regions actively used by these cells were observed.

Slight differences between primary RPE cells and ARPE-19 cells have been noted by others (Holtkamp et al., 1998; Philp et al., 2003). For example, Holtkamp et al. (1998) found that after stimulation with IL-1 β , secretion of IL-6 and IL-8 was polarized toward the basal side in primary cultures of human RPE cells, irrespective of the side of stimulation. The ARPE-19 cells also secreted these cytokines in a polarized fashion towards the basal side after basal stimulation, but polarized secretion was not apparent after apical stimulation. On most instance, however, the studies that have examined both cell types generally concluded that they yielded similar results. For example, the study of Liou et al. (2002) showed that tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor receptor (HGFR) and β -catenin occurs similarly in proliferating primary cultures of human RPE and ARPE-19 cells.

The results from the transfection analyses conducted in the present study suggested that the $\alpha 5$ promoter regulation is different when the same cell line is cultivated in a different growth medium. Indeed, comparison of the results obtained in confluent ARPE-19 cells grown either in DMEM/F12 (Fig. 4.3A) or in the Keratinocyte

medium (Fig. 4.3C), show that the activity directed by the -92 α 5CAT Δ MCS construct is reduced by 61% and the -132 α 5CAT Δ MCS plasmid by 72% when the cells are cultivated in the Keratinocyte media. However, the other constructs yielded similar promoter strengths regardless of the growth medium used. The integrin α 5 promoter has many consensus binding sites for several transcription factors, such as AP-1 (Birkenmeier et al., 1991; Corbi, Jensen and Watt, 2000), Sp1 (Birkenmeier et al., 1991; Larouche et al., 2000; Corbi et al., 2000), Ets (Birkenmeier et al., 1991), and C/EBP (Corbi et al., 2000). One major difference between the Keratinocyte-SFM medium and the DMEM/F12 medium is that the former was supplemented with 5% BCS and the latter with 10% FBS. Serum (Lamph et al., 1988; Ryder and Nathans, 1988) and growth factors (Quantin and Breathnach, 1988; Ryder and Nathans, 1988; Wu et al., 1989) are potent inducers of AP-1 activity. Serum also stimulates the Ets-1 promoter (Majerus et al., 1992). The different serum used could thus be involved in the differences in promoter strength seen between the two growth medium. However, this addresses the question of the influence of growth medium on gene regulation and needs further studies.

One additional advantage of using the ARPE-19 cell line include the fact that it has the ability to differentiate *in vitro* and to display differentiated properties similar to RPE cells *in vivo*, including the functional polarization of cellular organelles and the expression of RPE specific genes (Dunn et al., 1996). Thus, ARPE-19 cells would be useful for studying changes in gene expression between proliferating and differentiated cells within the same cell line. Gelfman et al. (1998) used this advantage to study the differences in transcriptional regulation of the FGF5 gene between proliferating and differentiated RPE cells, and Alizadeth et al. (2001) also used this advantage to study the downregulation of differentiation specific gene expression by oxidative stress. Liou et al. (2002) also investigated tyrosine phosphorylation of HGFR and β -catenin on proliferating and differentiated ARPE-19 cells. To study the differences in gene regulation and, most importantly, the levels to which transcription factors that regulate α 5 gene promoter function between undifferentiated and differentiated RPE cells would certainly be of interest. However, considerations should be taken regarding the potential

use of the APRE-19 cell line as a substitute for primary cultures of RPE cells in studies that are aimed at understanding gene regulation.

4.7 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the National Eyebank inc. (Quebec, Canada) for providing the human globes. Supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). SP held a joint scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the E.A. Baker Foundation from the Canadian National Institute for the Blind (CNIB). SL held a scholarship from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (NATEQ). CS and SLG are chercheur boursier national from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

4.8 REFERENCES

- Alizadeh, M., Wada, M., Gelfman, C.M., Handa, J.T. and Hjelmeland, L.M., 2001. Downregulation of differentiation specific gene expression by oxidative stress in ARPE-19 cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2706-13.
- Anderson, D.H., Guerin, C.J., Matsumoto, B. and Pfeffer, B.A., 1990. Identification and localization of a beta-1 receptor from the integrin family in mammalian retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 81-93.
- Aukunuru, J.V., Sunkara, G., Bandi, N., Thoreson, W.B. and Kompella, U.B., 2001. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in human retinal pigment epithelial cells and its interaction with BAPSG, a novel aldose reductase inhibitor. *Pharm. Res.* 18, 565-72.
- Baudouin, C. and Gastaud, P., 1994. [Vitreoretinal proliferation. II. Pathogenic hypotheses]. *J. Fr. Ophtalmol.* 17, 800-11.

- Beliveau, A., Leclerc, S., Rouleau, M. and Guerin, S.L., 1999. Multiple cloning sites from mammalian expression vectors interfere with gene promoter studies in vitro. *Eur. J. Biochem.* 261, 585-90.
- Birkenmeier, T.M., McQuillan, J.J., Boedeker, E.D., Argraves, W.S., Ruoslahti, E. and Dean, D.C., 1991. The alpha 5 beta 1 fibronectin receptor. Characterization of the alpha 5 gene promoter. *J. Biol. Chem.* 266, 20544-9.
- Boulanger, A. and Redmond, T.M., 2002. Expression and promoter activation of the Rpe65 gene in retinal pigment epithelium cell lines. *Curr. Eye Res.* 24, 368-75.
- Bridges, C.C., Ola, M.S., Prasad, P.D., El-Sherbeny, A., Ganapathy, V. and Smith, S.B., 2001. Regulation of taurine transporter expression by NO in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1825-36.
- Burke, J.M., Skumatz, C.M., Irving, P.E. and McKay, B.S., 1996. Phenotypic heterogeneity of retinal pigment epithelial cells in vitro and in situ. *Exp. Eye Res.* 62, 63-73.
- Corbi, A.L., Jensen, U.B. and Watt, F.M., 2000. The alpha2 and alpha5 integrin genes: identification of transcription factors that regulate promoter activity in epidermal keratinocytes. *FEBS Lett.* 474, 201-7.
- Dunn, K.C., Aotaki-Keen, A.E., Putkey, F.R. and Hjelmeland, L.M., 1996. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp. Eye Res.* 62, 155-69.
- Dunn, K.C., Marmorstein, A.D., Bonilha, V.L., Rodriguez-Boulan, E., Giordano, F. and Hjelmeland, L.M., 1998. Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2744-9.

- Elner, S.G. and Elner, V.M., 1996. The integrin superfamily and the eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 696-701.
- Fan, W., Zheng, J.J., Peiper, S.C. and McLaughlin, B.J., 2002. Changes in Gene Expression of ARPE-19 Cells in Response to Vitreous Treatment. *Ophthalmic Res.* 34, 357-65.
- Finnemann, S.C., Bonilha, V.L., Marmorstein, A.D. and Rodriguez-Boulan, E., 1997. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94, 12932-7.
- Fisher, S.K. and Anderson, D.H., 1989. Cellular effects of detachment on the neural retina and the retinal pigment epithelium. *Retinal Diseases* 165-89.
- Fukuoka, Y., Strainic, M. and Medof, M.E., 2003. Differential cytokine expression of human retinal pigment epithelial cells in response to stimulation by C5a. *Clin. Exp. Immunol.* 131, 248-53.
- Gao, X., Dinkova-Kostova, A.T. and Talalay, P., 2001. Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 98, 15221-6.
- Gelfman, C.M., Kelleher, C.M. and Hjelmeland, L.M., 1998. Differentiation of retinal pigment epithelial cells in vitro uncovers silencer activity in the FGF-5 gene promoter. *Exp. Eye Res.* 67, 151-62.
- Glaser, B.M. and Lemor, M., 1994. Pathobiology of proliferative vitreoretinopathy. *Retina* 2249-63.

- Graham, F.L. and van der Eb, A.J., 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52, 456-67.
- Handa, J.T., Reiser, K.M., Matsunaga, H. and Hjelmeland, L.M., 1998. The advanced glycation endproduct pentosidine induces the expression of PDGF-B in human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 66, 411-9.
- Holtkamp, G.M., Van Rossem, M., de Vos, A.F., Willekens, B., Peek, R. and Kijlstra, A., 1998. Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 112, 34-43.
- Honda, S., Farboud, B., Hjelmeland, L.M. and Handa, J.T., 2001. Induction of an aging mRNA retinal pigment epithelial cell phenotype by matrix-containing advanced glycation end products in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2419-25.
- Hunt, R.C., Pakalnis, V.A., Choudhury, P. and Black, E.P., 1994. Cytokines and serum cause alpha 2 beta 1 integrin-mediated contraction of collagen gels by cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 955-63.
- Hynes, R.O., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69, 11-25.
- Jin, M., He, S., Worpel, V., Ryan, S.J. and Hinton, D.R., 2000. Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 4324-32.
- Kim, K.S., Tezel, T.H. and Del Priore, L.V., 1998. The reattachment of adult human retinal pigment epithelium (RPE) to extracellular matrix (ECM) is mediated mainly by beta1 integrin subunit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sc.* 39, S98.

- Kupper, T.S. and Ferguson, T.A., 1993. A potential pathophysiologic role for alpha 2 beta 1 integrin in human eye diseases involving vitreoretinal traction. *Faseb J.* 7, 1401-6.
- Lamph, W.W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. and Verma, I.M., 1988. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature.* 334, 629-31.
- Larouche, K., Leclerc, S., Salesse, C. and Guerin, S.L., 2000. Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro. *J. Biol. Chem.* 275, 39182-92.
- Lin, H. and Clegg, D.O., 1998. Integrin alphavbeta5 participates in the binding of photoreceptor rod outer segments during phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 1703-12.
- Liou, G.I., Matragoon, S., Samuel, S., Behzadian, M.A., Tsai, N.T., Gu, X., Roon, P., Hunt, D.M., Hunt, R.C., Caldwell, R.B. and Marcus, D.M., 2002. MAP kinase and beta-catenin signaling in HGF induced RPE migration. *Mol. Vis.* 8, 483-93.
- Majerus, M.A., Bibollet-Ruche, F., Telliez, J.B., Wasylyk, B. and Bailleul, B., 1992. Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter. *Nucleic Acids Res.* 20, 2699-703.
- McKay, B.S. and Burke, J.M., 1994. Separation of phenotypically distinct subpopulations of cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp Cell Res.* 213, 85-92.
- McKay, B.S., Irving, P.E., Skumatz, C.M. and Burke, J.M., 1997. Cell-cell adhesion molecules and the development of an epithelial phenotype in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 65, 661-71.

- Meitinger, D., Hunt, D.M., Shih, D.T., Fox, J.C. and Hunt, R.C., 2001. Vitreous-induced modulation of integrins in retinal pigment epithelial cells: effects of fibroblast growth factor-2. *Exp. Eye Res.* 73, 681-92.
- Miceli, M.V., Newsome, D.A. and Tate, D.J., Jr., 1997. Vitronectin is responsible for serum-stimulated uptake of rod outer segments by cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1588-97.
- Mousa, S.A., Lorelli, W. and Campochiaro, P.A., 1999. Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *J. Cell Biochem.* 74, 135-43.
- Nicoletti, A., Kawase, K. and Thompson, D.A., 1998. Promoter analysis of RPE65, the gene encoding a 61-kDa retinal pigment epithelium-specific protein. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 637-44.
- Pfeffer, B.A., 1991. Improved Methodology for Cell Culture of Human and Monkey Retinal Pigment Epithelium. *Progress in retinal Research* 10, 251-91.
- Philp, N.J., Wang, D., Yoon, H. and Hjelmeland, L.M., 2003. Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1716-21.
- Pothier, F., Ouellet, M., Julien, J.P. and Guerin, S.L., 1992. An improved CAT assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells. *DNA Cell Biol.* 11, 83-90.
- Proulx, S., Guerin, S.L. and Salesse, C., 2003. Effect of quiescence on integrin alpha5beta1 expression in human retinal pigment epithelium. *Mol. Vis.* 9, pagination pending.

- Quantin, B. and Breathnach, R., 1988. Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature*. 334, 538-9.
- Robbins, S.G., Brem, R.B., Wilson, D.J., O'Rourke, L.M., Robertson, J.E., Westra, I., Planck, S.R. and Rosenbaum, J.T., 1994. Immunolocalization of integrins in proliferative retinal membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 3475-85.
- Ryan, S.J., 1993. Traction retinal detachment. XLIX Edward Jackson Memorial Lecture. *Am. J. Ophthalmol.* 115, 1-20.
- Ryder, K. and Nathans, D., 1988. Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85, 8464-7.
- Selden, R.F., Howie, K.B., Rowe, M.E., Goodman, H.M. and Moore, D.D., 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3173-9.
- Singh, S., Zheng, J.J., Peiper, S.C. and McLaughlin, B.J., 2001. Gene expression profile of ARPE-19 during repair of the monolayer. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 239, 946-51.
- Sparrow, J.R., Zhou, J., Ben-Shabat, S., Vollmer, H., Itagaki, Y. and Nakanishi, K., 2002. Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1222-7.
- Tezel, T.H., Del Priore, L.V. and Kaplan, H.J., 1997. Harvest and storage of adult human retinal pigment epithelial sheets. *Curr. Eye Res.* 16, 802-9.
- Tornøe, J., Kusk, P., Johansen, T.E. and Jensen, P.R., 2002. Generation of a synthetic mammalian promoter library by modification of sequences spacing transcription factor binding sites. *Gene*. 297, 21-32.

- Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J. and Van Obberghen, E., 2001. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 276, 43836-41.
- Wada, M., Gelfman, C.M., Matsunaga, H., Alizadeh, M., Morse, L., Handa, J.T. and Hjelmeland, L.M., 2001. Density-dependent expression of FGF-2 in response to oxidative stress in RPE cells in vitro. *Curr. Eye Res.* 23, 226-31.
- Wang, D., Birkenmeier, T.M., Yang, J., Venkateswarlu, S., Humphrey, L., Brattain, M.G. and Sun, L., 1995. Release from quiescence stimulates the expression of integrin alpha 5 beta 1 which regulates DNA synthesis in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J. Cell. Physiol.* 164, 499-508.
- Weigel, A.L., Handa, J.T. and Hjelmeland, L.M., 2002. Microarray analysis of H₂O₂-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1419-32.
- Weller, M., Wiedemann, P. and Heimann, K., 1990. Proliferative vitreoretinopathy--is it anything more than wound healing at the wrong place? *Int. Ophthalmol.* 14, 105-17.
- Wu, B.Y., Fodor, E.J., Edwards, R.H. and Rutter, W.J., 1989. Nerve growth factor induces the proto-oncogene c-jun in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 264, 9000-3.
- Yang, C.H., Huang, T.F., Liu, K.R., Chen, M.S. and Hung, P.T., 1996. Inhibition of retinal pigment epithelial cell-induced tractional retinal detachment by disintegrins, a group of Arg-Gly-Asp-containing peptides from viper venom. *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 37, 843-54.

Zhao, M.W., Jin, M.L., He, S., Spee, C., Ryan, S.J. and Hinton, D.R., 1999. A distinct integrin-mediated phagocytic pathway for extracellular matrix remodeling by RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis .Sci.* 40, 2713-23.

4.9 FIGURES

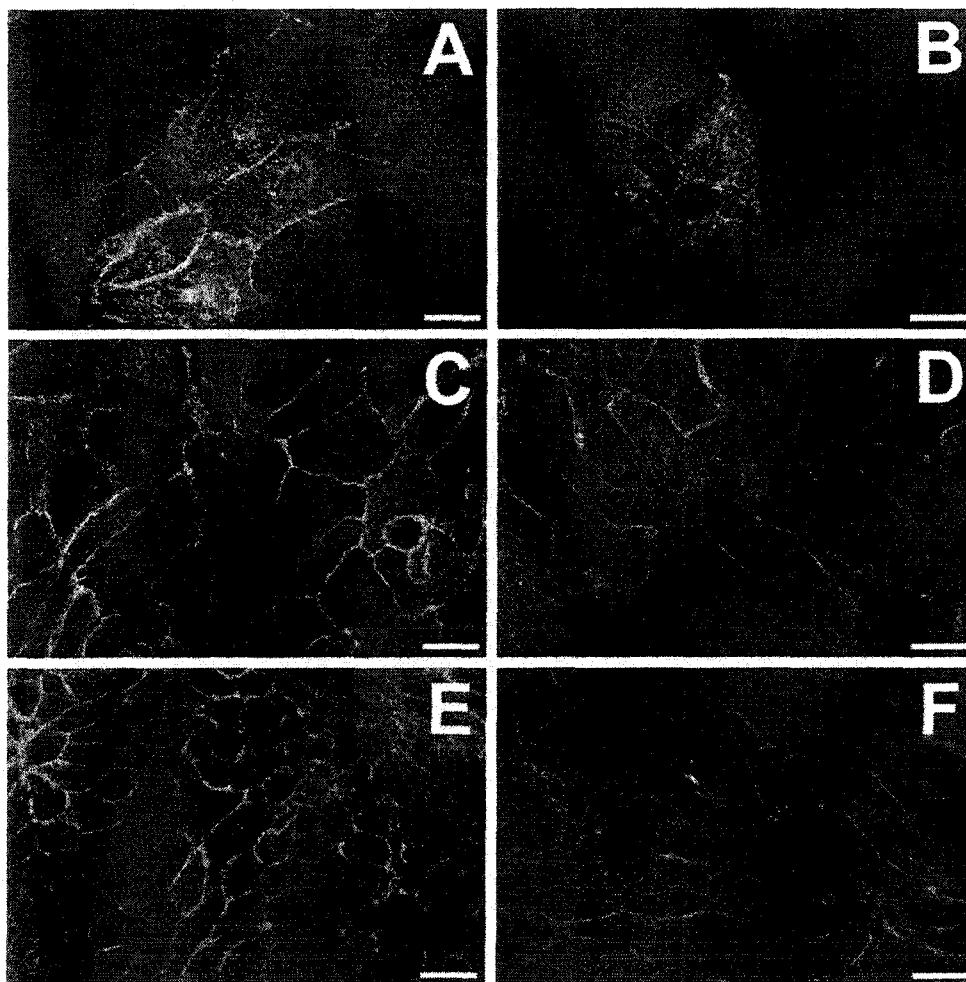


Figure 4.1 Immunofluorescence detection of integrin $\alpha 5$ on RPE cells. Sub-confluent (A, B), confluent (C, D) and post confluent (E, F) primary human RPE cells (A, C, E) and ARPE-19 cells (B, D, F) were incubated with an anti- $\alpha 5$ integrin antibody and the $\alpha 5$ /Ab complex was revealed using Alexa 488-labeled anti-mouse IgG. Scale bar = 20 μ m

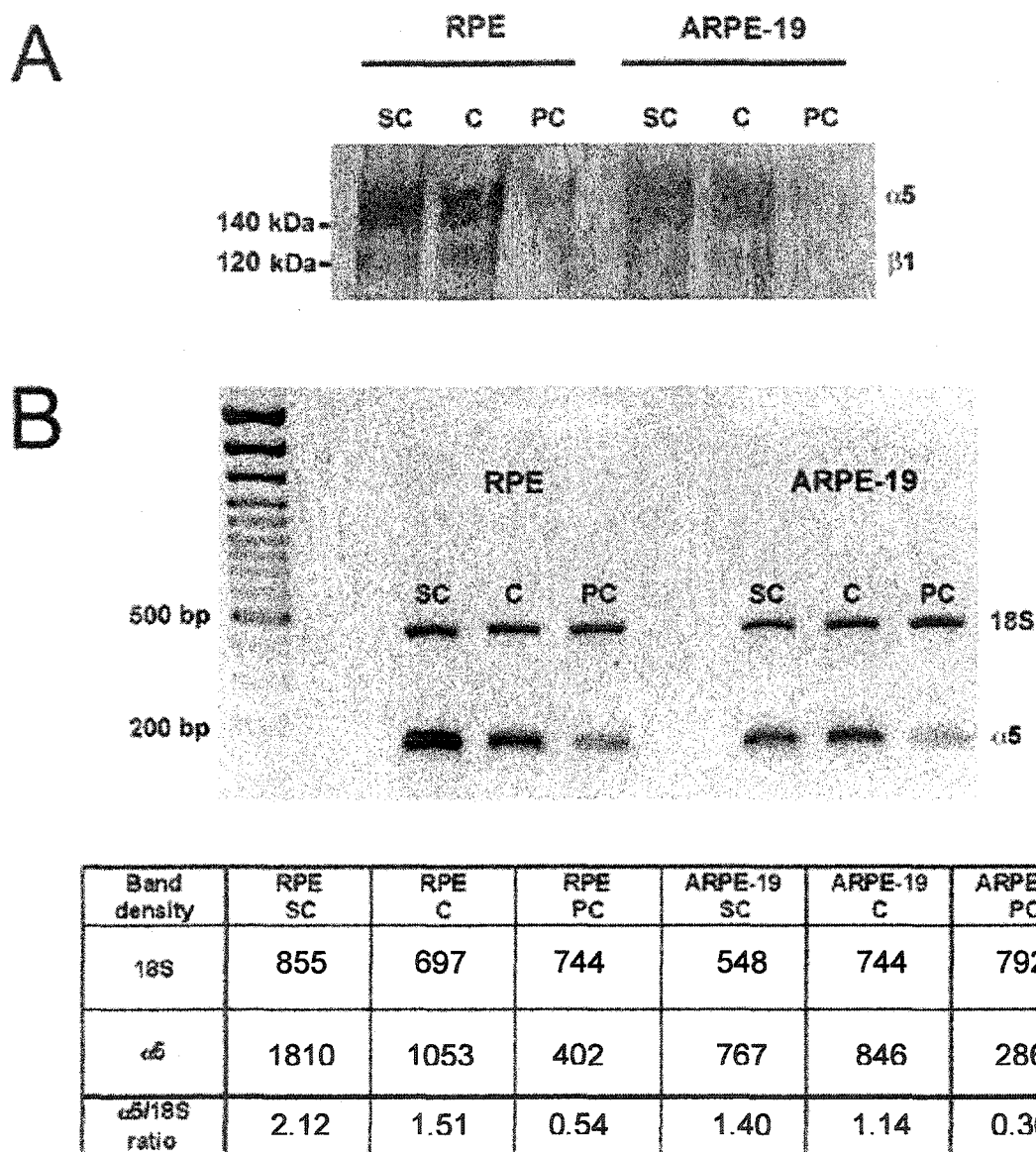


Figure 4.2 Effect of confluency on cell surface protein levels and mRNA levels. Sub-confluent (SC), confluent (C) and post-confluent (PC) RPE and ARPE-19 cells were used for detection of the $\alpha 5$ cell surface protein (A) and $\alpha 5$ transcript (B). A) RPE and ARPE-19 cells were harvested, labeled with soluble sulfo-NHS-LC-Biotin and immunoprecipitated with anti-integrin $\alpha 5$ antibody under denaturing conditions. B) *Upper panel.* Integrin $\alpha 5$ amplification products were obtained and normalized to the 18S PCR product for semi quantitative evaluation. *Lower panel.* Band density calculated by the Scion software (see materials and methods).

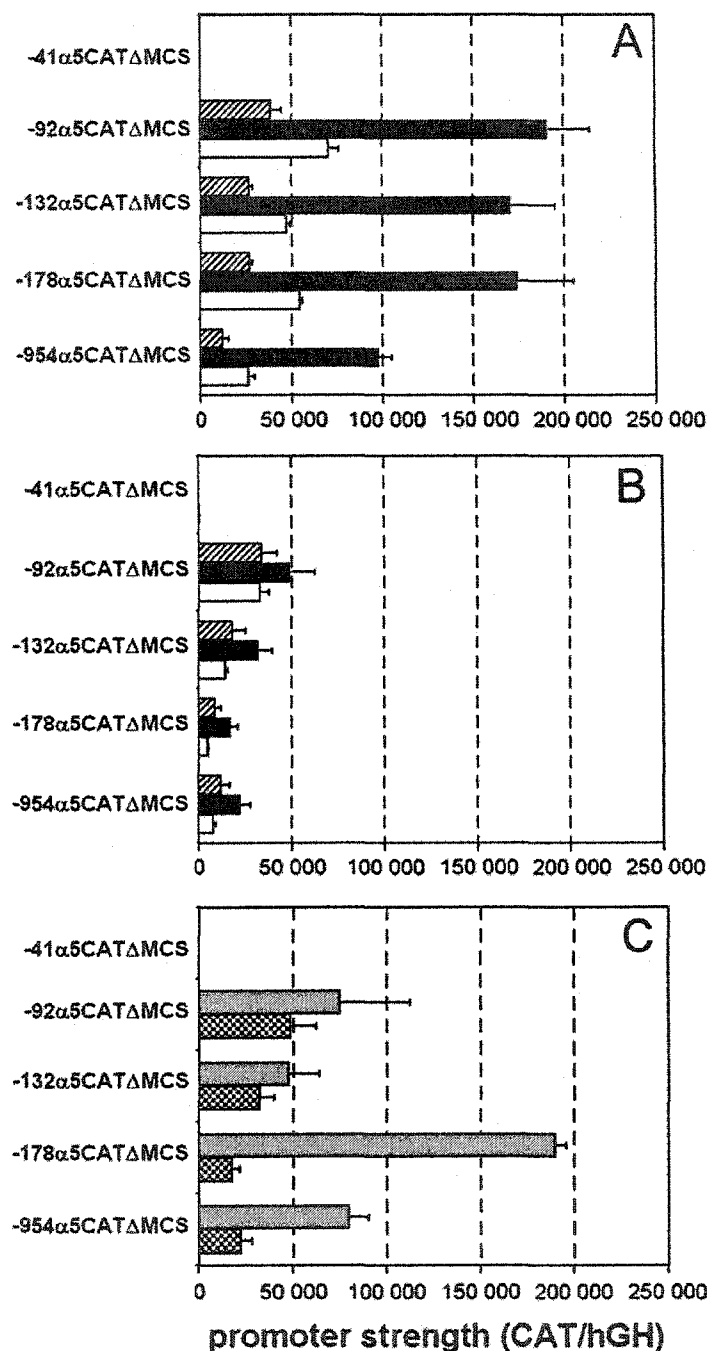


Figure 4.3 Integrin $\alpha 5$ promoter activity in primary cultures of RPE cells and ARPE-19.

The CAT activity obtained with plasmid $-41\alpha 5\text{CAT}\Delta\text{MCS}$ was so low that no box can be seen at the scale used in figures A, B and C. Sub-confluent (dashed boxes), confluent (black boxes) and post-confluent (white boxes) cultures of A) ARPE-19 cells ($n = 9$) and B) primary cultures of human RPE cells ($n = 24$ for sub-confluent cells, $n = 30$ for confluent cells and $n = 9$ for

post-confluent cells) were transiently transfected with recombinant plasmids bearing the CAT reporter gene fused to various promoter segments from the human $\alpha 5$ gene. Levels of CAT activity for the transfected cells were determined and normalized to the amount of hGH secreted into the culture media. Values are presented with standard deviation. C) Integrin $\alpha 5$ promoter activity in primary cultures of RPE and ARPE-19 cells cultured in the same growth medium. Figure C shows mean promoter strength (\pm SD) upon transfection of confluent cultures from both the ARPE-19 cell line (grey box, $n = 3$) and primary human RPE cells (dotted box, $n = 30$) grown in the Keratinocyte-SFM medium and transiently transfected with recombinant plasmids bearing the CAT reporter gene fused to various promoter segments from the human $\alpha 5$ gene.

CHAPITRE 5

INTEGRIN SUBUNIT $\alpha 4$ EXPRESSION ON HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS

Manuscrit soumis à la revue

Experimental Eye Research

**Integrin subunit $\alpha 4$ expression on
human retinal pigment epithelial cells**

Stéphanie Proulx¹, Sylvain L. Guérin² and Christian Salesse^{1,*}

¹Unité de recherche en ophtalmologie, ² Oncology and Molecular Endocrinology
Research Center, Centre de recherche du CHUQ, Pavillon CHUL, Faculté de
médecine, Université Laval Ste-Foy, Quebec, Canada

*To whom correspondance should be adressed: Unité de Recherche en
Ophtalmologie, Centre de Recherche du CHUQ, Pavillon CHUL, Salle S-5, 2705
Boul. Laurier, Ste-Foy, Quebec, Canada, G1V 4G2, phone: (418) 656-4141 ext
7243, fax: (418) 654-2131, e-mail: christian.salesse@crchul.ulaval.ca

SHORT TITLE: Integrin $\alpha 4$ expression by human RPE

KEYWORDS: human RPE, integrin $\alpha 4$, promoter, confluence

5.1 RÉSUMÉ

Les intégrines forment une famille de protéines transmembranaires qui médient des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire. La sous-unité $\alpha 4$ est surtout exprimée par les cellules du système immunitaire et son expression est peu abondante parmi les cellules non-hématopoïétiques. Peu de choses sont connues sur l'expression de la sous-unité $\alpha 4$ par les cellules de l'EPR. Nous avons voulu mieux caractériser son expression par ces cellules. Nous avons démontré l'expression de la sous-unité $\alpha 4$ sur l'EPR à l'aide de cryosections de rétines humaines. Les résultats d'immunofluorescence obtenus avec des cellules de l'EPR en culture ont démontré que la sous-unité $\alpha 4$ était aussi exprimée *in vitro*. Des analyses par RT-PCR semi-quantitatif et de transfections transitoires ont démontré que la transcription du gène $\alpha 4$ ainsi que l'activité du promoteur $\alpha 4$ diminuait légèrement entre les deux confluences testées.

5.2 ABSTRACT

Integrins are a family of transmembrane glycoproteins that mediate cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions. The integrin $\alpha 4$ subunit is widely expressed on cells from the immune system and its expression on non-haematopoietic cells is scarce. Little is known about its expression in the retinal pigment epithelium (RPE). This study was thus undertaken to characterize the expression of the $\alpha 4$ integrin subunit by human RPE cells. Retinal cryosections clearly showed that this integrin is expressed *in situ* by RPE cells. Moreover, immunofluorescence analyses also demonstrated that the $\alpha 4$ subunit is expressed by these cells which is supported by the observation of its transcript by RT-PCR in sub-confluent and confluent primary cultures. Finally, transient transfections of several recombinant constructs of the human $\alpha 4$ gene promoter showed that

expression of this protein is regulated in a manner similar to that observed in other tissues.

5.3 INTEGRIN SUBUNIT $\alpha 4$ EXPRESSION ON HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS

Integrins are a family of transmembrane glycoproteins that mediate cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions (Elnor and Elnor, 1996). They mediate many cellular processes, including adhesion, proliferation, migration and differentiation (Elnor and Elnor, 1996). Integrins are heterodimeric molecules, composed of an α subunit, which confers the ECM ligand specificity, and a β subunit, which determines the broad class of the receptor (Elnor and Elnor, 1996). The $\alpha 4$ subunit associates with the $\beta 1$ and the $\beta 7$ subunit (Aota and Yamada, 1995; Elnor and Elnor, 1996; Hemler et al., 1990; Wehrle-Haller and Imhof, 2003). Integrins $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 4\beta 7$ mediate adhesion to the immunoglobulin vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as well as to the alternatively spliced CS-1 region of the ECM protein fibronectin (FN) (Aota and Yamada, 1995; Elnor and Elnor, 1996; Hemler et al., 1990; Wehrle-Haller and Imhof, 2003), although $\alpha 4\beta 7$ binds these two ligands with less affinities than $\alpha 4\beta 1$ (Chan et al., 1992).

The integrin $\alpha 4\beta 1$, also known as very late antigen-4 (VLA-4), mediates both cell-cell and cell-ECM interactions and consequently plays an important role in development and cell differentiation. *In vivo*, antibodies that block $\alpha 4$ and VCAM-1 inhibited the development of the sympathetic innervation of the heart (Wingard et al., 2002). In the embryonic retina, integrin $\alpha 4\beta 1$ is expressed by retinal ganglion cells and by undifferentiated retinal neuroblasts, where it is proposed to function as a mediator for neurite outgrowth on VCAM-1, FN and osteopontin (Hikita et al., 2003). In the mature human retina, $\alpha 4$ expression is present on cells from the outer nuclear layer, including rods and cones, on cells from the inner nuclear layer, as well as ganglion cells and on the retinal pigment

epithelial (RPE) cells (Brem et al., 1994). However, the $\alpha 4$ staining of human RPE cells observed by Brem et al. (1994) is difficult to assess. Indeed, the reddish coloration observed through the natural brown pigmentation of RPE cells in their immunohistochemical sections is as strong as the one observed for their negative control. In contrast, the $\alpha 4$ subunit has not been found on RPE cells when cultured *in vitro* (Hunt et al., 1994). Thus, aside from the possible observation that the $\alpha 4$ subunit is present on RPE cells *in situ*, little is known about its expression in these cells. The aim of the present study was therefore to examine in more detail both the expression and regulation of expression of the integrin $\alpha 4$ subunit on human RPE cells.

Immunofluorescence analyses were performed using donor retinas isolated from human eyes obtained from the National Eyebank Inc. (Québec, Qc, Canada) within 24h of death, in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki. Integrin $\alpha 4$ subunit was detected using both a rabbit polyclonal antibody directed against this integrin subunit (Chemicon, Temecula, CA) and the secondary antibody Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR). Crysections were subjected to sequential excitation with the 488 nm line (green) and the 568 nm line (red) of the krypton/argon laser in order to distinguish residual autofluorescence of lipofuscin (orange/yellow) from the $\alpha 4$ -specific immunoreactivity (green), as recently described (Proulx, Guérin and Salesse, 2003). As revealed in Figure 5.1A, expression of $\alpha 4$ was readily detected *in situ* in the RPE monolayer, with a more intense staining on the apical surface of the cells. A positive staining for this integrin subunit was also observed in the choroids. The negative control performed using normal rabbit serum showed very weak fluorescence (Figure 5.1B).

Immunofluorescence was also performed on cultured RPE cells grown on glass coverslips. Primary cultures of RPE cells were established from human eyes. Cells were maintained in Keratinocyte-SFM medium (Canadian Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 5% bovine calf

serum (Hyclone, Logan, Utah, USA) and various vitamins and proteins, as described (Proulx et al., 2003). A monoclonal antibody directed against the $\alpha 4$ integrin subunit (mouse anti-human integrin $\alpha 4$, clone HP2/1, Cedarlane, Hornby, ON, Canada) was used to identify the presence of this integrin on RPE cells *in vitro*. A weak $\alpha 4$ signal was detected on subconfluent RPE cells, with a more intense staining at the cell edges (Figure 5.1C). Cells that reached confluency had a stronger $\alpha 4$ staining at cell-cell contacts (Figure 5.1D). We therefore conclude that the $\alpha 4$ integrin subunit accumulates at the cell membrane of RPE cells as they become confluent *in vitro*. The $\alpha 4\beta 1$ integrin has been reported to bind to itself (Altevogt et al., 1995; Qian, Vaux and Weissman, 1994). Therefore, the increase in cell-cell contacts which are typical of confluent cultures may facilitate detection of this integrin by promoting its clustering at the cell edges and therefore explain the high fluorescent staining at this particular location in confluent cells. RPE cells are known to secrete extracellular matrix *in vitro*, including FN (Campochiaro, Jerdan and Glaser, 1986; Yamakawa et al., 1987). The production of FN by RPE cells in confluent cultures may also influence both the expression of $\alpha 4$ and its location at the cell surface. Indeed, expression of the FN binding integrin subunit $\alpha 5$ gene was found to be dramatically increased through a MAPK-dependent pathway when primary cultured rabbit corneal epithelial cells are grown in the presence of FN (Larouche et al., 2000). Most of all, expression of the $\alpha 4$ integrin subunit was also recently reported to be similarly affected by FN although through a signalization process other than the MAPK pathway (Zaniolo et al., 2003). As RPE cells are known to secrete FN *in vitro* (Campochiaro et al., 1986; Yamakawa et al., 1987), it is expected that expression of the $\alpha 4$ gene will also be positively influenced by this ECM ligand as well.

In order to evaluate the amount of $\alpha 4$ mRNA transcript present at different cell densities, total RNA from cultured RPE cells was isolated and semi-quantitative RT-PCR was performed as described (Proulx et al., 2003). When

normalized to the amount of transcripts encoded by the ribosomal 18S gene, a small decrease in band intensity between sub-confluent and confluent RPE cells was observed (Figure 5.2A). Given that the levels of integrin $\alpha 4$ subunit mRNA was influenced by cell confluence, we next determined whether the transcriptional activity normally driven by the $\alpha 4$ gene promoter is also similarly regulated upon transient transfection of $\alpha 4$ promoter/CAT recombinant constructs into both sub-confluent and confluent RPE cells. The plasmids selected for these assays contained the CAT reporter gene fused to different lengths from the human $\alpha 4$ gene promoter that extend to various 5' positions relative to the $\alpha 4$ mRNA start site (-1000 $\alpha 4$ CAT, -200 $\alpha 4$ CAT, -120 $\alpha 4$ CAT, -76 $\alpha 4$ CAT, -41 $\alpha 4$ CAT (recombinant plasmids were obtained from Dr. Glenn D. Rosen; Division of Pulmonary and Critical Care, Department of Medicine, Stanford University Medical Center, Stanford, California 94304, USA). Cells were transiently transfected using the calcium phosphate precipitation method as described (Proulx et al., 2003).

As shown on figure 5.2B, no significant differences in promoter activity was observed between sub-confluent and confluent cells. Figure 5.2B also shows that basal promoter activity was obtained with plasmid -41 $\alpha 4$ CAT. Extending the $\alpha 4$ promoter up to position -76 resulted in a 4.1-fold and a 4.5-fold increase in promoter activity for sub-confluent and confluent RPE cultures, respectively, suggesting the presence of positive regulatory elements located within the -41 to -76 promoter segment. Extending further 5' the $\alpha 4$ promoter resulted in a progressive reduction of $\alpha 4$ promoter activity to reach levels 18 and 13-times lower with plasmid -1000 $\alpha 4$ CAT relative to the activity directed by the -76 $\alpha 4$ CAT construct for sub-confluent and confluent cells, respectively.

Similar results were also reported in other cells types (Audet et al., 1994; Postigo et al., 1997; Rosen et al., 1994). One particularly important regulatory region along the $\alpha 4$ promoter is located between positions -42 and -76. Indeed,

potential binding sites for the Ets family of transcription factors have been identified in this region (Rosen et al., 1994). Besides, the binding of five distinct nuclear regulatory proteins from rabbit corneal epithelial cells to a short segment from the -41/-76 area, designated as the $\alpha 4.1$ element, has been reported to be of importance for basal $\alpha 4$ promoter activity in these cells (Larouche et al., 1996). One out of these five proteins, namely Bp5, was recently recognized as the transcription factor Pax-6 (Zaniolo et al., 2003), a member of the paired domain family of transcription factors whose expression was found to be required for proper vertebrate eye development, maintenance and healing (Macdonald and Wilson, 1996). As Pax-6 has been reported to be required, along with Pax-2, in the differentiation process of RPE cells likely through their regulatory action on the expression of the transcription factor Mitf (Baumer et al., 2003), it would prove interesting to investigate whether expression of $\alpha 4$ in primary cultured RPE cells can be accounted for by abnormally elevated levels of Pax-6 in these cells.

Given that the expression of the $\alpha 4$ integrin subunit is scarce in non-haematopoietic cells and that it binds an alternatively spliced segment of FN that is normally expressed only during wound healing (Ffrench-Constant, 1995; Ffrench-Constant and Hynes, 1989; Ffrench-Constant et al., 1989), its expression by RPE cells is intriguing and shall deserve more studies.

5.4 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Banque Nationale d'Yeux (Quebec, Canada) for providing the human globes. We also would like to thank Marcelle Giasson (from the CHUL Research Center) for her precious help with the CAT assays. Supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). SP held a joint studentship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the E.A. Baker Foundation from the Canadian National Institute for the Blind (CNIB). CS and SLG are chercheur boursier national from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

5.5 REFERENCES

- Altevoigt, P., Hubbe, M., Ruppert, M., Lohr, J., von Hoegen, P., Sammar, M., Andrew, D.P., McEvoy, L., Humphries, M.J. and Butcher, E.C., 1995. The alpha 4 integrin chain is a ligand for alpha 4 beta 7 and alpha 4 beta 1. *J Exp Med.* 182, 345-55.
- Aota, S. and Yamada, K.M., 1995. Fibronectin and cell adhesion: specificity of integrin-ligand interaction. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 70, 1-21.
- Audet, J.F., Masson, J.Y., Rosen, G.D., Salesse, C. and Guerin, S.L., 1994. Multiple regulatory elements control the basal promoter activity of the human alpha 4 integrin gene. *DNA Cell Biol.* 13, 1071-85.
- Baumer, N., Marquardt, T., Stoykova, A., Spieler, D., Treichel, D., Ashery-Padan, R. and Gruss, P., 2003. Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6. *Development.* 130, 2903-15.
- Brem, R.B., Robbins, S.G., Wilson, D.J., O'Rourke, L.M., Mixon, R.N., Robertson, J.E., Planck, S.R. and Rosenbaum, J.T., 1994. Immunolocalization of integrins in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35, 3466-74.
- Campochiaro, P.A., Jordan, J.A. and Glaser, B.M., 1986. The Extracellular Matrix of Human Retinal Pigment Epithelial Cells In Vivo and its Synthesis In Vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 27, 1615-21.
- Chan, B.M., Elices, M.J., Murphy, E. and Hemler, M.E., 1992. Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin. Comparison of alpha 4

beta 1 (VLA-4) and alpha 4 beta 7 on the human B cell line JY. *J Biol Chem.* 267, 8366-70.

Elner, S.G. and Elner, V.M., 1996. The integrin superfamily and the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37, 696-701.

Ffrench-Constant, C., 1995. Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res.* 221, 261-71.

Ffrench-Constant, C. and Hynes, R.O., 1989. Alternative splicing of fibronectin is temporally and spatially regulated in the chicken embryo. *Development.* 106, 375-88.

Ffrench-Constant, C., Van de Water, L., Dvorak, H.F. and Hynes, R.O., 1989. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol.* 109, 903-14.

Hemler, M.E., Elices, M.J., Parker, C. and Takada, Y., 1990. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev.* 114, 45-65.

Hikita, S.T., Cann, G.M., Wingerd, K.L., Mullick, L.H., Wayne, W.C., Webb, S.W. and Clegg, D.O., 2003. Integrin alpha4beta1 (VLA-4) expression and activity in retinal and peripheral neurons. *Mol Cell Neurosci.* 23, 427-39.

Hunt, R.C., Pakalnis, V.A., Choudhury, P. and Black, E.P., 1994. Cytokines and serum cause alpha 2 beta 1 integrin-mediated contraction of collagen gels by cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35, 955-63.

- Larouche, K., Leclerc, S., Giasson, M. and Guerin, S.L., 1996. Multiple nuclear regulatory proteins bind a single cis-acting promoter element to control basal transcription of the human alpha 4 integrin gene in corneal epithelial cells. *DNA Cell Biol.* 15, 779-92.
- Larouche, K., Leclerc, S., Salesse, C. and Guerin, S.L., 2000. Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro. *J Biol Chem.* 275, 39182-92.
- Macdonald, R. and Wilson, S.W., 1996. Pax proteins and eye development. *Curr Opin Neurobiol.* 6, 49-56.
- Postigo, A.A., Sheppard, A.M., Mucenski, M.L. and Dean, D.C., 1997. c-Myb and Ets proteins synergize to overcome transcriptional repression by ZEB. *Embo J.* 16, 3924-34.
- Proulx, S., Guérin, S.L. and Salesse, C., 2003. Effect of quiescence on integrin alpha5beta1 expression in human retinal pigment epithelium. *Mol Vis.* 9, 473-81.
- Qian, F., Vaux, D.L. and Weissman, I.L., 1994. Expression of the integrin alpha 4 beta 1 on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation. *Cell.* 77, 335-47.
- Rosen, G.D., Barks, J.L., Iademaro, M.F., Fisher, R.J. and Dean, D.C., 1994. An intricate arrangement of binding sites for the Ets family of transcription factors regulates activity of the alpha 4 integrin gene promoter. *J Biol Chem.* 269, 15652-60.

- Wehrle-Haller, B. and Imhof, B.A., 2003. Integrin-dependent pathologies. *J Pathol.* 200, 481-7.
- Wingerd, K.L., Goodman, N.L., Tresser, J.W., Smail, M.M., Leu, S.T., Rohan, S.J., Pring, J.L., Jackson, D.Y. and Clegg, D.O., 2002. Alpha 4 integrins and vascular cell adhesion molecule-1 play a role in sympathetic innervation of the heart. *J Neurosci.* 22, 10772-80.
- Yamakawa, R., Shirakawa, H., Okada, M., Yoshimura, N., Matsumura, M. and Ogino, N., 1987. Retinal pigment epithelial cells produce fibronectin. *Ophthalmic Res.* 19, 338-43.
- Zaniolo, K., Leclerc, S., Cvekl, A., Bazin, K., Larouche, K. and Guérin, S.L., 2003. Expression of the alpha4 integrin subunit gene promoter is modulated by the transcription factor Pax-6 in corneal epithelial cells. *Inves Ophthalmol Vis Sc.*, accepted pending revisions.

5.6 FIGURES

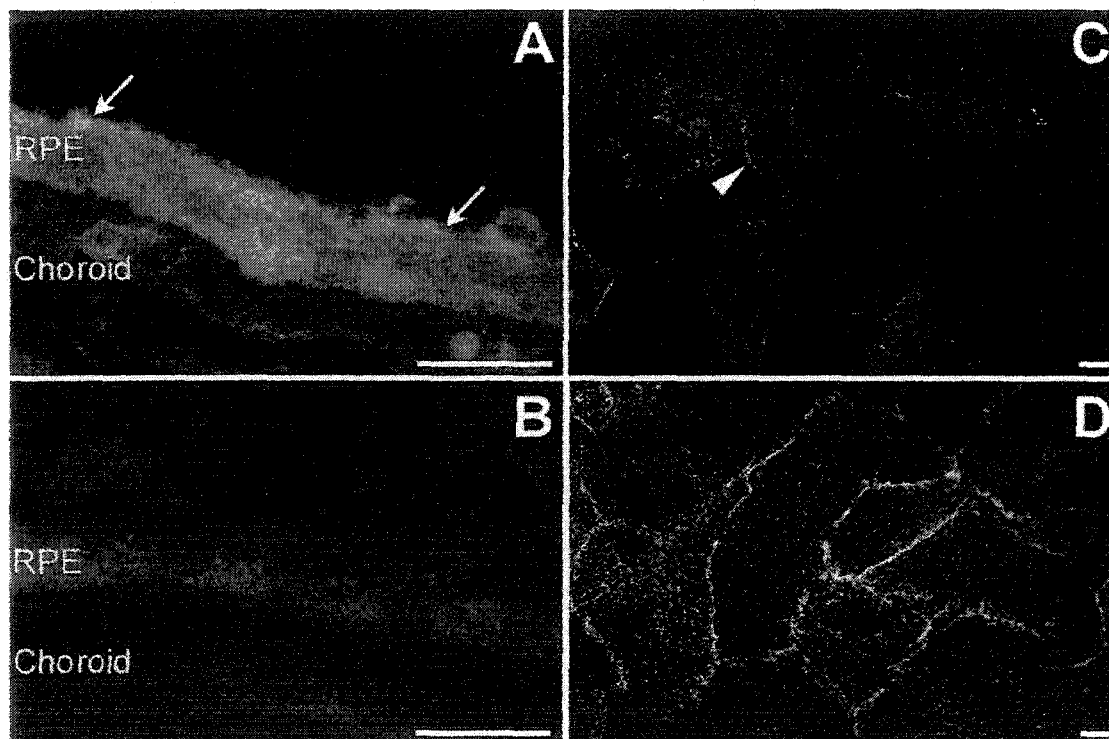


FIGURE 5.1: Immunofluorescence analysis of the $\alpha 4$ integrin subunit on cryosections of a human retina (A,B) and on cultured human RPE cells (C,D). A) Specific immunoreactivity appears green and lipofuscin autofluorescence appears as orange/yellow. Integrin $\alpha 4$ subunit is detected diffusely throughout the cell surface, and more intense staining is found at the apical surface of the RPE monolayer (arrows). The neural retina peeled off during cryosection processing. B) Negative control using normal rabbit serum. C) Sub-confluent cells are positively labeled for $\alpha 4$ at cell borders (arrowhead), D) A more intense staining is observed at cell-cell contacts of confluent cells. Scale bar represents 20 μm .

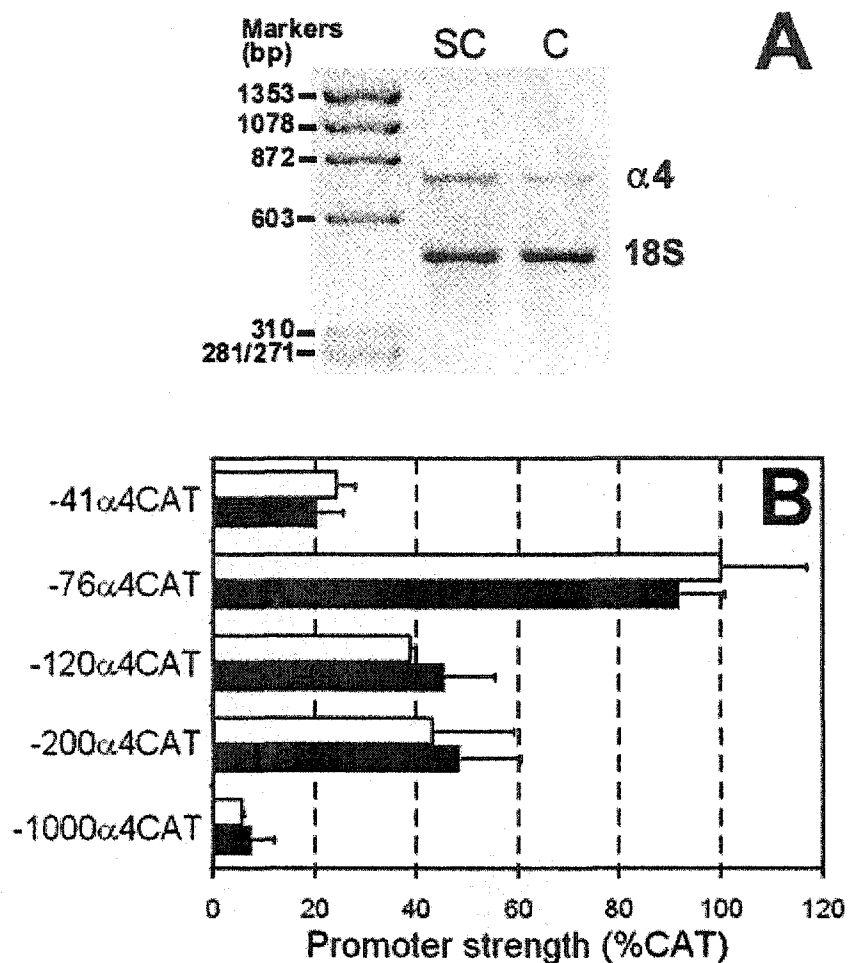


FIGURE 5.2: Expression of $\alpha 4$ transcripts and $\alpha 4$ promoter activity in cultured human RPE cells. A) Integrin $\alpha 4$ RT-PCR amplification products were obtained from sub-confluent (SC) and confluent (C) cultures and normalized to the 18S PCR product for semi quantitative evaluation. The DNA sequence of the primers used for the amplification of the human $\alpha 4$ transcript were: forward primer: 5'-TGGCGTGGT-ACAACTTGACTG-3', reverse primer: 5'-CATGCGCAACATTTTCATCCT-3' (772 bp PCR product) and cycle parameters were 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 30 sec. The 18S primers (Ambion, Austin, Texas) gave a PCR product of 489 bp. B) Sub-confluent (white box) and confluent (black box) cell cultures (n= 6) were transiently transfected with recombinant plasmids bearing the CAT reporter gene fused to various promoter segments from the human $\alpha 4$ gene. Levels of CAT activity for the transfected cells were determined and normalized to the amount of hGH secreted into the culture media. Values are presented with standard deviation.

CHAPITRE 6

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

6.1 CHAPITRE 2 : INFLUENCE DU PASSAGE ET DE LA CRYOPRÉSERVATION SUR L'EXPRESSION DE L'INTÉGRINE $\alpha 5$ PAR LES CELLULES DE L'EPR

6.1.1 Récapitulation des résultats et discussion

Cette série d'expériences a mis en évidence l'importance de travailler avec constance lorsqu'on utilise des cultures de cellules non-transformées provenant de tissus sains. Nous avons démontré que la force du promoteur $\alpha 5$ chutait de façon importante suite aux passages de cultures d'EPR (Figure 2.1). Il semble donc que plus les cellules de l'EPR subissent de divisions cellulaires, moins le promoteur $\alpha 5$ est actif. Ceci démontre aussi que lorsqu'on veut conclure sur la régulation d'un quelconque gène étudié chez les cultures primaires, il importe de toujours utiliser les cellules qui sont non seulement cultivées au même passage, mais aussi qui ont étéensemencées à la même densité cellulaire et de les laisser proliférer pour la même période entre les passages, et ce, afin de travailler avec des cellules qui ont subi un nombre similaire de divisions cellulaires.

On sait déjà que les cellules provenant de cultures primaires subissent un nombre limité de divisions cellulaires avant d'atteindre la sénescence *in vitro*. Il a préalablement été démontré que les cellules de l'EPR bovin deviennent sénescents suite à 26 divisions cellulaires (224) alors que les cellules de l'EPR humain deviennent sénescents suite à 15 divisions cellulaires (225). Normalement, les cellules de l'EPR se divisent uniquement afin de remplacer une cellule voisine morte au cours du processus normal de vieillissement (226). Forcer la prolifération des cellules en culture se compare donc à accélérer leur « vieillissement ». Afin d'étudier la régulation d'un gène dans des conditions se rapprochant le plus de la réalité, il est donc important d'utiliser des cellules qui ont subi peu de divisions cellulaires. Pour la suite de nos travaux, nous avons ainsi toujours utilisé des cellules au passage 2 ensemencées à des densités cellulaires précises et à des temps d'adhérence fixes.

Lors des premiers essais de transfections transitoires, nous avons utilisé des cellules « fraîches » (non-cryopréservées) et des cellules cryopréservées. Nous avons remarqué que l'activité du promoteur $\alpha 5$ des cellules cryopréservées était beaucoup plus faible que celle des cellules fraîches. Nous avons donc étudié plus en détail l'effet de la cryopréservation sur l'activité du promoteur $\alpha 5$. En transfectant des cellules du même donneur, au même passage, dont une partie des cellules avait été utilisée immédiatement (fraîches) et l'autre partie cryopréservée dans l'azote liquide pour une période de 20 semaines avant la décongélation, nous avons démontré que la cryopréservation se traduisait par une diminution d'environ 70% dans l'activité du promoteur $\alpha 5$ (Figure 2.2A et B).

Sachant que certains milieux de cryopréservation peuvent s'avérer plus efficaces pour la congélation de différents types de cellules, nous avons comparé l'activité du promoteur $\alpha 5$ de cellules cryopréservées dans 2 autres milieux de cryopréservation, appelés cryosolutions 2 et 3. Ces deux autres cryosolutions n'ont pas empêché davantage que la cryosolution initiale (appelée cryosolution 1) la diminution de l'activité du promoteur $\alpha 5$ suite à la cryopréservation (Figure 2.2C). Nous avons aussi immunoprécipité la sous-unité $\alpha 5$ des cellules avant et après leur cryopréservation dans le but d'estimer les quantités de protéines qui se retrouvaient à la surface des cellules de l'EPR. En accord avec les résultats des transfections transitoires, nous avons observé que la quantité de protéine diminuait aussi suite à la cryopréservation, et ce, peu importe le milieu de cryopréservation utilisé (Figure 2.3). Afin d'obtenir des résultats cohérents sur l'activité du promoteur $\alpha 5$ des cellules de l'EPR, nous avons donc pris la décision de ne plus utiliser de cellules cryopréservées.

Une étude a démontré que la cryopréservation menait à une induction prématurée de la sénescence sur une lignée cellulaire d'EPR appelée RPE340 (227). Il semble donc que la sénescence apparaît non seulement suite à la

prolifération mais aussi suite à la cryopréservation. Nos résultats sont en accord avec cette étude puisque, dans les deux cas, une diminution de l'activité du promoteur $\alpha 5$ est observée. Cette régulation génique négative à l'approche de la sénescence n'affecte pas tous les gènes. En effet, une augmentation de l'ARNm de l'IGFBP-2 (« insulin growth factor binding protein-2) et une diminution de l'ARNm du collagène I $\alpha 2$, du bFGF (« basic fibroblast growth factor ») et de FGF-5 (« fibroblast growth factor-5 ») a été observée chez les cellules sénescents de l'EPR (228).

6.1.2 Perspectives de recherche

Puisqu'un grand nombre de cellules est nécessaire à la réalisation de nos études, on ne peut évidemment pas empêcher la prolifération des cellules *in vitro* (donc l'augmentation du nombre de divisions cellulaires) et les changements dans l'activité des gènes qui s'ensuit. Par contre, améliorer le milieu de culture et le milieu de cryopréservation pourrait minimiser les diminutions dans l'activité du promoteur $\alpha 5$ observées suite à l'augmentation du nombre de divisions cellulaires et à la cryopréservation. Par exemple, Valtink et al. (229) ont mis au point un milieu de culture amélioré pour la culture des cellules de l'EPR humain. Ce milieu est constitué du milieu de culture de base F99 additionné de 15% de milieu conditionné par la choroïde, 10% de sérum de veau fœtal, 1mM de pyruvate de sodium, 1 μ g/ml d'insuline et des antibiotiques (229). Pour obtenir le milieu conditionné par la choroïde, les auteurs ont incubé la choroïde (recueillie suite à la dissection) pendant 4 jours avec du milieu de culture F99 additionné de 1% de sérum de veau fœtal. Durant cette période, les cellules de la choroïde secrèteraient des facteurs de croissance et des protéines qui favoriseraient une meilleure croissance des cellules de l'EPR en culture (230). Maintenues dans ce milieu, les cellules de l'EPR semblent conserver leurs caractéristiques de cellules différenciées *in vitro* suite à leur mise en culture et à leur cryopréservation. On pourrait alors ré-évaluer l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ suite à des changements dans la composition du milieu de culture et trouver un milieu plus approprié pour la culture de

cellules de l'EPR. Des changements pourraient également être apportés au milieu de cryopréservation afin de diminuer l'impact du gel/dégel sur les cellules de l'EPR et possiblement empêcher la diminution de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$. Des études supplémentaires seraient donc nécessaires afin d'améliorer les milieux de congélation.

6.1.3 Rapport de l'intensité des bandes

Sur la figure 2.3, on note que la bande $\alpha 5$ est plus faible que la bande $\beta 1$. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus aux figures 3.3 et 4.2, où l'on observe que la bande $\alpha 5$ est plus forte que la bande $\beta 1$. Cette différence en intensité des bandes s'explique par les différentes conditions expérimentales. En effet, au chapitre 2, lors de l'électrophorèse, les protéines ont été mises dans un tampon Laemmli ne contenant pas de mercaptoéthanol, alors qu'aux chapitres 3 et 4, les protéines étaient dans un tampon Laemmli contenant 5% de mercaptoéthanol. On s'explique mal pourquoi la présence de mercaptoéthanol affecte tant le rapport de l'intensité des bandes $\alpha 5/\beta 1$. Par contre, il semble que ce soit bel et bien la présence ou l'absence de mercaptoéthanol qui en soit la cause. L'expérience de la figure 6.1 a été effectuée avec les mêmes échantillons en même temps. La seule différence est que ceux-ci ont été incubés dans un tampon Laemmli non-réducteur (sans mercaptoéthanol) (figure 6.1A) ou réducteur (avec 5% de mercaptoéthanol) (figure 6.1B). Cette figure démontre bien qu'en absence de mercaptoéthanol la bande $\alpha 5$ est moins intense que la bande $\beta 1$, alors qu'en présence de mercaptoéthanol la bande $\alpha 5$ est plus intense que la bande $\beta 1$. Une hypothèse serait que la présence de mercaptoéthanol dans le tampon engendrerait des changements conformationnels (notamment le bris d'un pont dissulfure sur la sous-unité α) qui rendrait les biotines plus accessibles et qui augmenterait donc l'intensité de la bande $\alpha 5$.

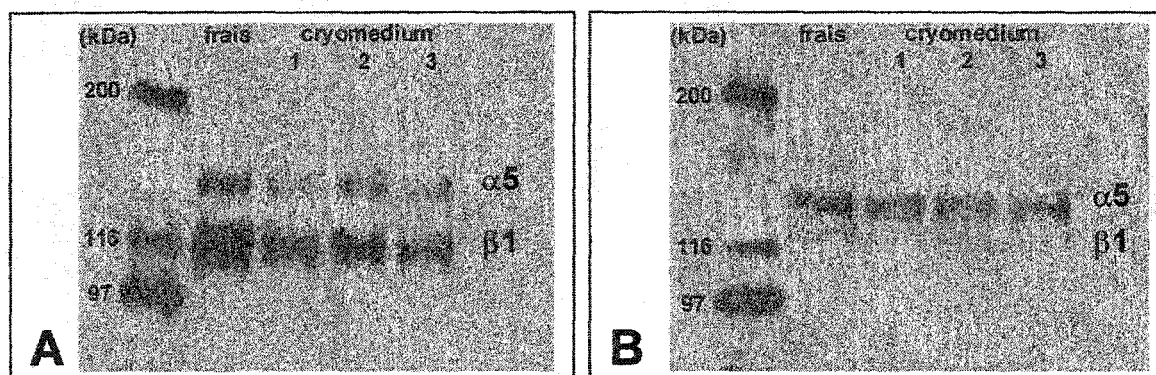


Figure 6.1 : Immunoprécipitation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Des cellules de l'EPR ont été immunoprécipitées avant congélation (frais) et suite à 20 semaines de congélation dans 3 milieux de cryopréservation différents (cryomedium 1, 2 et 3). Pour l'électrophorèse, les protéines immunoprécipitées ont été incubées dans un tampon Laemmli A) non-réducteur (sans mercaptoéthanol). B) réducteur (avec 5% de mercaptoéthanol).

6.2 CHAPITRES 3 ET 4 : EXPRESSION DE LA SOUS-UNITÉ $\alpha 5$ PAR LES CELLULES DE L'EPR

6.2.1 Récapitulation des résultats et discussion

L'objectif des travaux présentés consistait à comparer l'expression (protéique et génique) de la sous-unité $\alpha 5$ par les cellules de l'EPR différenciées et proliférantes avec l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ des cellules quiescentes ayant amorcée leur différenciation *in vitro*. Nous avons aussi comparé les résultats obtenus à l'aide de cellules en culture primaire avec ceux obtenus avec les cellules de la lignée ARPE-19.

6.2.1.1 Évaluation de la quiescence des cellules en culture

Une technique utilisée afin d'analyser la prolifération cellulaire consiste à mesurer la synthèse d'ADN (231). Le bromo-déoxy-uridine (BrdU) est un

analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN lorsque la cellule est dans la phase de synthèse d'ADN (phase S du cycle cellulaire). La détection du BrdU est donc un moyen couramment utilisé pour évaluer si la cellule est en phase active de prolifération (231). Au contraire, si le BrdU n'est pas détecté, cela signifie que la cellule s'est retirée du cycle cellulaire (phase G₀), un état aussi appelé quiescence (231). Lorsque les cellules de l'EPR sont confluentes depuis 2 jours, elles incorporent encore le BrdU dans leur noyau, ce qui signifie que les cellules à ce stade sont encore prolifique (Figure 3.2A). Lorsque les cellules sont confluentes depuis deux semaines, peu de cellules incorporent le BrdU dans leur noyau (Figure 3.2B). Ces résultats indiquent que la majorité des cellules à ce stade ont atteint la quiescence cellulaire.

6.2.1.2 Expression protéique de la sous-unité $\alpha 5$

La présence de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'EPR de rétines normales était controversée. Il existe en effet deux études qui soulignent l'absence de la sous-unité $\alpha 5$ (149,212) et une autre qui note sa présence chez l'EPR *in situ* (213). Nous avons donc tout d'abord évalué la présence de cette sous-unité en utilisant des coupes de rétines normales. Nous avons démontré que la sous-unité $\alpha 5$ était normalement exprimée à la surface des cellules de l'EPR différenciées, et que son expression était baso-latérale (Figure 3.1). Ces résultats sont en accord avec ceux de Anderson et al. (213).

En accord avec la littérature (62,146,214-220), nous avons aussi observé, par immunofluorescence, que la sous-unité $\alpha 5$ était présente sur les cellules de l'EPR *in vitro* en culture primaire et ce, sur des cellules proliférantes et des cellules quiescentes (Figure 4.1). Les résultats sont similaires pour la lignée ARPE-19 (Figure 4.1). Les cellules non-confluentes démontrent un marquage hétérogène, en agglomérat à la surface cellulaire, ainsi qu'un marquage à la bordure de la membrane cellulaire, alors que le marquage pour les cellules confluentes se retrouve au pourtour des cellules.

La microscopie confocale permet d'observer la fluorescence à différents niveaux de profondeur dans la cellule (axe z). Ainsi, en balayant l'échantillon de la base de la lamelle (face basale) jusqu'à la surface supérieure de la cellule (face apicale), nous avons observé que le marquage de la sous-unité $\alpha 5$ sur les cellules de l'EPR *in vitro* était aussi baso-latéral pour les cellules confluentes (Figure 6.1) et post-confluentes. En effet, sur la face basale, on retrouve un marquage diffus sur toute la surface cellulaire, ainsi qu'un marquage plus intense au bord des cellules. Le marquage est aussi observé au bord des cellules, démontrant une expression latérale de la sous-unité $\alpha 5$. Presqu'aucun marquage $\alpha 5$ positif n'a été observé sur la face apicale des cellules de l'EPR.

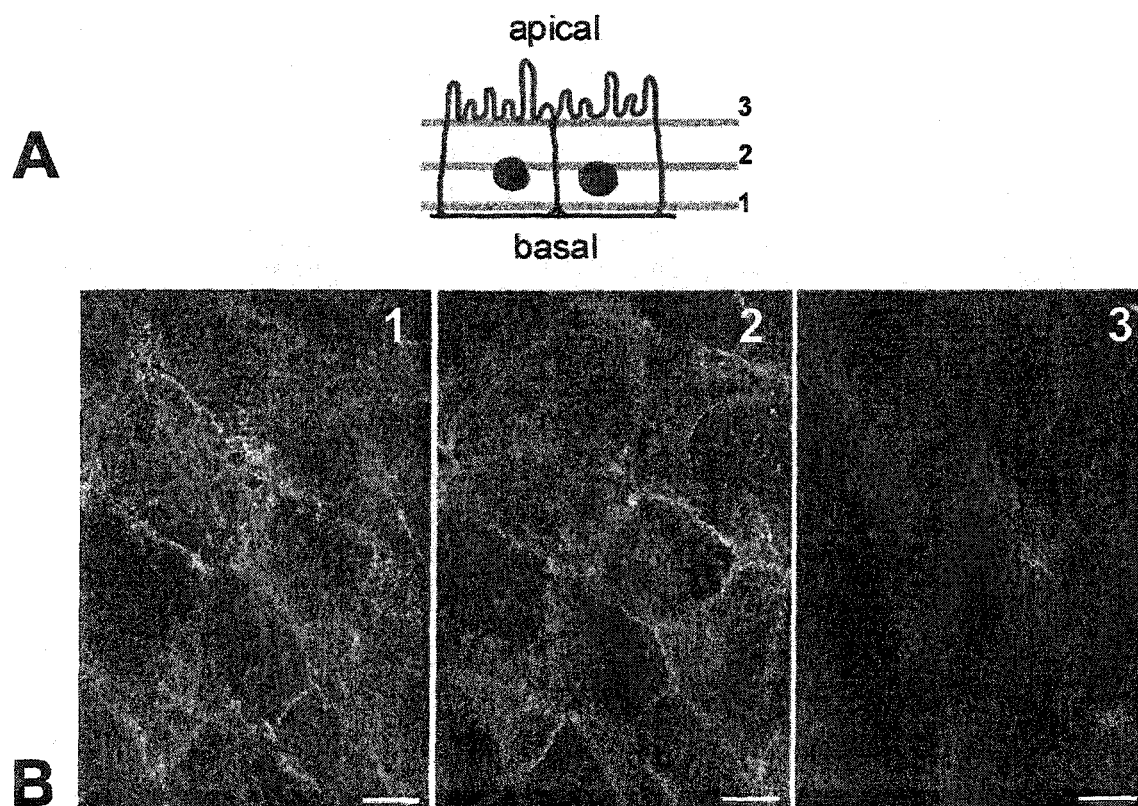


Figure 6.2 : Détection par immunofluorescence de la sous-unité $\alpha 5$ des cellules de l'EPR confluentes par microscopie confocale. A) schématisation des différentes coupes observées. B) Détection de la sous-unité $\alpha 5$ 1) au niveau basal, 2) au centre, 3) au niveau apical. Barre = 10 μ m.

La technique de marquage par immunofluorescence est qualitative et ne permet pas de conclure quant à la quantité de protéine se retrouvant sur les cellules. Par immunoprécipitation, nous avons démontré que la quantité d'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ diminuait lorsque les cellules devenaient quiescentes, autant pour les cultures primaires (Figure 3.3) que pour la lignée ARPE-19 (Figure 4.2A). Ces résultats sont les premiers qui démontrent que la quantité de protéine $\alpha 5 \beta 1$ varie lorsque les cellules de l'EPR deviennent quiescentes.

6.2.1.3 Expression du gène $\alpha 5$

Nous avons aussi démontré que la diminution dans la quantité de protéine à la surface des cellules suite à la quiescence cellulaire était la conséquence d'une diminution du niveau de transcrit $\alpha 5$, et ce, autant pour des cellules provenant de cultures primaires (Figure 3.4) que de la lignée ARPE-19 (Figure 4.2B). Finalement, nous avons démontré que cette diminution du transcrit $\alpha 5$ suite à la quiescence était aussi observée au niveau de l'activité du promoteur $\alpha 5$ (Figures 3.5 et 4.3B pour les cultures primaires et Figure 4.3A pour ARPE-19). Ces résultats sont les premiers qui démontrent que la quiescence affecte le niveau de transcription et l'activité du promoteur $\alpha 5$ chez les cellules de l'EPR.

6.2.1.4 Régulation du promoteur $\alpha 5$ des cultures primaires des cellules de l'EPR

Les premiers plasmides utilisés pour l'étude de l'activité du promoteur $\alpha 5$ des cellules de l'EPR avaient été obtenus du Dr. Birkeinmeier (Washington University School of Medicine, St Louis, MO). Les résultats des transfections transitoires réalisées avec les plasmides recombinants $\alpha 5$ /CAT sont présentés à la figure 6.2A. Ils montrent une augmentation successive de l'activité du promoteur entre -41 et -178 pb, puis une diminution de l'activité du promoteur entre -178 et -954 pb. Ces résultats sont également été observés avec d'autres

lignées cellulaires, notamment chez les cellules de l'épithélium cornéen non-confluent (222) et les cellules de fibrosarcome (197).

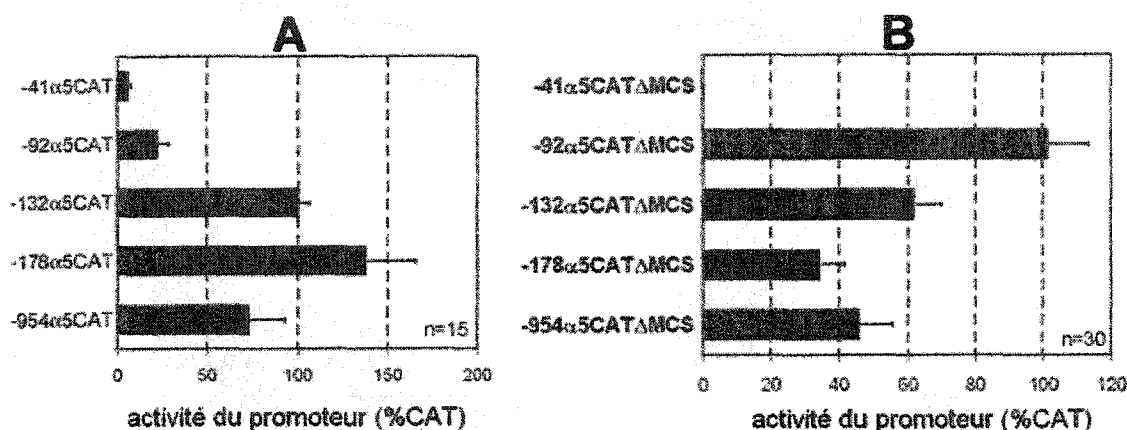


Figure 6.3 : Activité du promoteur $\alpha 5$ des cellules de l'EPR confluentes. Les cellules ont été transfectées en utilisant A) les plasmides contenant le site de multiclonage, B) les plasmides Δ MCS.

Lors de la construction des plasmides, l'équipe du Dr. Birkenmeier a inséré les différents segments du promoteur $\alpha 5$ dans le site de multiclonage (« multicloning site » ou MCS) du vecteur d'expression pBluescriptTM en amont du gène rapporteur chloramphenicol acétyl transférase. Des travaux réalisés par l'équipe du Dr. Guérin ont permis de démontrer que le MCS de pBluescriptTM avait le potentiel de lier des protéines nucléaires. Il fallait donc vérifier si cette région n'interférait pas avec l'activité du promoteur $\alpha 5$. L'étude qui s'en suivit (232) démontre qu'effectivement la présence du MCS altère dramatiquement l'activité du promoteur de la sous-unité $\alpha 5$ d'une façon totalement imprévisible. Cette altération dépend de la distance entre le MCS et le site d'initiation de la transcription du promoteur basal et conduit à une interprétation erronée des données de transfection.

Nous avons donc préféré répéter les transfections transitoires avec de nouveaux plasmides dénudés du site de multiclonage, appelés Δ MCS, dont un résultat est illustré en exemple à la figure 6.2B. Lorsqu'on compare les résultats

des transfections transitoires réalisées en utilisant les plasmides comprenant le site de multiclonaage et les plasmides Δ MCS, on observe que chez l'EPR, la présence du MCS altère dramatiquement l'activité du promoteur de la sous-unité $\alpha 5$.

Les plasmides Δ MCS ont donc été utilisés afin de réaliser les transfections transitoires présentés dans les manuscrits du chapitre 3 et 4. Pour les cultures primaires (Figures 3.5 et 4.3B), les résultats de transfections transitoires avec ces nouveaux plasmides ont démontré qu'il n'y avait pas d'activité du promoteur $\alpha 5$ pour le plasmide -41 $\alpha 5$ CAT Δ MCS. En allongeant le plasmide jusqu'à la position -92 pb, nous avons obtenu une forte augmentation en activité du promoteur, soit des augmentations de 232, 255 et 51 fois pour, respectivement, les cellules non-confluentes, confluentes et post-confluentes. Lorsque le plasmide -92 $\alpha 5$ CAT Δ MCS est allongé jusqu'à la position -132 puis -178, nous obtenons une diminution de l'activité du promoteur, soit des diminutions de 3, 3 et 7 fois entre -92 et -178 pb pour les cellules non-confluentes, confluentes et post-confluentes, respectivement. Il n'y a pas de changement significatif lorsque le plasmide -178 $\alpha 5$ CAT Δ MCS est allongé jusqu'à la position -954 pb. Ces résultats suggèrent qu'un ou plusieurs élément(s) de régulation positive se situent entre les positions -41 et -92 pb et qu'un ou des élément(s) de régulation négative se situent entre les positions -92 et -178 pb.

6.2.1.5 Régulation de l'activité du promoteur $\alpha 5$ des cellules de la lignée ARPE-19 et comparaison avec les résultats obtenus avec les cultures primaires.

Les résultats des transfections transitoires avec la lignée ARPE-19 ont démontré plusieurs différences dans la régulation du promoteur $\alpha 5$ induites dans cette lignée par opposition aux cultures primaires (Figure 4.3). La première différence majeure concerne la force du promoteur $\alpha 5$. En effet, l'activité du promoteur $\alpha 5$ est beaucoup plus importante avec la lignée ARPE-19. Par

exemple, le plasmide -178 α 5CAT Δ MCS démontre une activité promotrice dans les cellules ARPE-19 plus de 10 fois supérieure à celle obtenue dans les cellules en culture primaire à la même confluence.

On retrouve aussi des différences dans l'activité des différentes régions régulatrices du promoteur α 5 (Figure 4.3). Tout comme les cultures primaires, les cellules de la lignée ARPE-19 ne démontrent pas une activité promotrice α 5 significative pour le plasmide -41 α 5CAT Δ MCS. Par contre, contrairement aux cultures primaires, on ne retrouve pas de régulation négative entre les positions -92 et -178 pb. Il existe cependant chez les cellules de la lignée ARPE-19 une région de régulation négative située entre -178 et -954 pb qui n'est pas présente dans les cultures primaires. Il semble donc que pour les cellules de la lignée ARPE-19, il existe des facteurs de transcription de régulation négatifs entre les positions -178 et -954 pb qui ne sont apparemment pas fonctionnels dans les cultures primaires.

Les cultures primaires d'EPR sont maintenues dans du milieu Kératinocyte-SFM additionné de 5% de sérum bovin et plusieurs vitamines et protéines, alors que les cellules de la lignée ARPE-19 sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 additionné de 10% de sérum de veau foetal. Nous nous sommes demandé si ces différences fonctionnelles observées pour le promoteur α 5 n'étaient pas dues aux différents milieux de culture utilisés. Nous avons alors réalisé des transfections transitoires avec des cellules confluentes de la lignée ARPE-19 mais cette fois maintenues dans le même milieu de culture que celui utilisé pour les cultures primaires (Figure 4.3C). Lorsqu'on compare les résultats des cultures primaires et des cellules de la lignée ARPE-19 cultivées dans le même milieu de culture, on remarque que l'activité du promoteur α 5 est similaire pour les plasmides -41 α 5CAT Δ MCS, -92 α 5CAT Δ MCS et -132 α 5CAT Δ MCS. Par contre, le promoteur est toujours beaucoup plus puissant pour les plasmides -178 α 5CAT Δ MCS et -954 α 5CAT Δ MCS, soit une augmentation de 11 et 3.5 fois dans l'activité du

promoteur $\alpha 5$ pour, respectivement, les cellules de la lignée ARPE-19 comparativement aux cellules provenant de cultures primaires. De plus, chez les cultures primaires, on observe une diminution de l'activité de l'ordre de 50% lorsque le promoteur $\alpha 5$ est allongé de la position -132 à la position -178 pb, réduction qui demeure ensuite stable entre les positions -178 et -954. Toutefois, chez les cellules ARPE-19, on note une forte augmentation (4 fois) entre les positions -132 et -178 suivie d'une diminution de 2.4 fois entre les positions -178 et -954. Il semble donc que les différences notées à la figure 4.3 ne soient pas uniquement dues à l'effet du milieu de culture. Ces résultats démontrent donc qu'il existe des différences fondamentales dans la régulation du gène $\alpha 5$ entre les cellules provenant de cultures primaires et celles de la lignée ARPE-19. En considérant ces différences dans la régulation du promoteur $\alpha 5$, nous avons pris la décision de ne pas utiliser la lignée ARPE-19 pour la poursuite de nos travaux.

Les transfections transitoires effectuées en utilisant les mêmes cellules cultivées dans deux milieux de culture différents ont permis d'observer les effets du milieu de culture sur la régulation du promoteur $\alpha 5$. La figure 6.3 compare les résultats des transfections transitoires des cellules ARPE-19 confluentes cultivées dans du DMEM/F12 (Figure 4.3A) et dans du Kératinocyte-SFM (Figure 4.3C).

L'analyse de ces résultats démontre que l'activité du promoteur $\alpha 5$ du plasmide -92 $\alpha 5$ CAT Δ MCS est diminuée de 61% et celle du plasmide -132 $\alpha 5$ CAT Δ MCS est diminuée de 72% lorsque les cellules de la lignée ARPE-19 sont cultivées dans du Kératinocyte-SFM. Par contre, les plasmides -41 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, -178 $\alpha 5$ CAT Δ MCS et -954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS ont une activité promotrice similaire peu importe le milieu de culture utilisé. Il semble donc que le milieu de culture influence l'activité du promoteur $\alpha 5$.

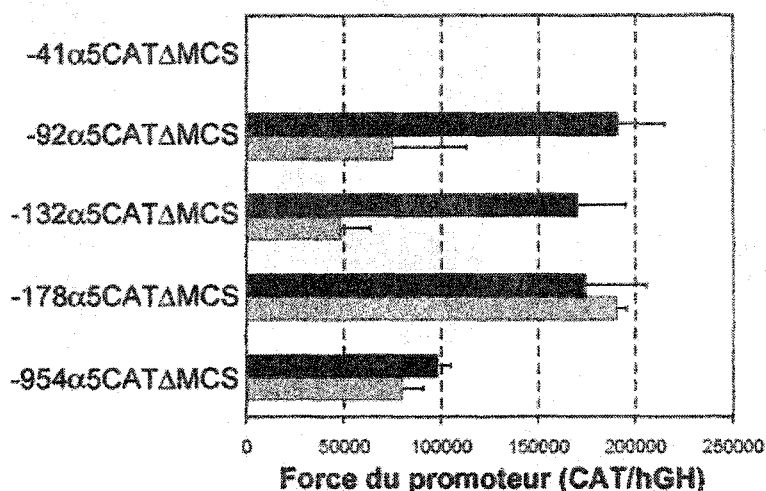


Figure 6.4 : Transfections transitoires effectuées sur les cellules de la lignée ARPE-19 confluentes cultivées dans du milieu DMEM/F12 (noir) et du milieu Kératinocyte-SFM (gris).

Comme expliqué à la section 1.8.4, le promoteur $\alpha 5$ contient plusieurs sites de liaison pour des protéines nucléaires telles AP-1, Ets, Sp1 et C/EBP (143,197,221). Le sérum et les facteurs de croissances sont des activateurs du facteur de transcription AP-1 (233-236). Le sérum stimule aussi le promoteur des facteurs de transcription à domaines Ets (237). Il est donc possible que les différents sérums utilisés soient en partie responsables des différences notées dans l'activité promotrice entre les deux milieux de culture. Des études supplémentaires sont par contre nécessaires afin de déterminer l'effet du milieu de culture ou du sérum sur l'activité du promoteur $\alpha 5$.

6.2.2 Perspectives de recherche

6.2.2.1 Régulation de l'activité du promoteur $\alpha 5$

Étant donné que la sous-unité $\alpha 5$ puisse être impliquée dans le comportement aberrant des cellules de l'EPR retrouvé dans les décollements de la rétine, il apparaît important d'étudier plus en détail les éléments régulateurs du promoteur $\alpha 5$. Les transfections réalisées avec le plasmide

-92 α 5CAT Δ MCS génèrent une forte activité promotrice. Ce segment doit donc contenir des éléments de régulation positive qu'il serait important d'identifier dans la région située entre les positions -41 et -92 pb du promoteur de l'intégrine α 5. Comme précédemment décrit à la section 1.8.4, plusieurs facteurs de transcription sont connus pour lier cette région, tels Sp1, AP-1, et C/EBP (221,222). Des études préliminaires en analyse de rétention de gel, effectuées par l'équipe du Dr Guérin, ont démontré que les facteurs de transcription Sp1 et Ap1 étaient présents dans les cellules de l'EPR et que leur expression (ou affinité pour la sonde) diminuait lorsque ces cellules devenaient quiescentes (238). Il serait donc intéressant de vérifier si ces facteurs de transcription lient aussi le promoteur α 5 chez les cellules de l'EPR et si la quiescence cellulaire affecte le niveau des facteurs de transcription qui se lient au promoteur.

6.2.2.2 Influence du vitré

Lors de la vitréorétinopathie proliférante, les cellules de l'EPR entrent en contact avec le vitré. Lorsqu'on met des cellules de l'EPR en culture en présence de vitré, les cellules se détachent du Pétri, changent de morphologie (elles prennent la forme de fibroblastes), migrent et prolifèrent dans le vitré (239-242), soit un comportement similaire à celui retrouvé lors de la vitréorétinopathie proliférante (136). De plus, il a été démontré que lorsque les cellules de l'EPR étaient mises en contact avec du vitré en culture, il y a augmentation de l'expression de la protéine α 5 à la surface des cellules de l'EPR (217). Cette étude démontre aussi que lorsque la sous-unité α 5 est surexprimée à la surface des cellules de l'EPR, celles-ci changent de morphologie pour prendre l'aspect de fibroblastes. Ces résultats suggèrent donc qu'une augmentation de l'expression de l'intégrine α 5 β 1 suite au contact du vitré pourrait être responsable de la dé-différenciation des cellules de l'EPR lors de la vitréorétinopathie proliférante.

Une avenue de recherche intéressante consisterait donc à évaluer l'influence du vitré sur l'activité du promoteur $\alpha 5$. Des études préliminaires, réalisées par les étudiantes Marie-Ève Gingras et Anne Rufiange de l'équipe du Dr Guérin, sont d'ailleurs en cours sur ce sujet. Des transfections transitoires ont été réalisées à l'aide du plasmide -954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS, sur des cellules non-confluentes, en présence et en absence de vitré (Figure 6.4) (238). Les résultats démontrent que la présence du vitré augmente l'activité du promoteur $\alpha 5$. Une activité maximale a été obtenue avec une concentration de 8% de vitré dans le milieu de culture.

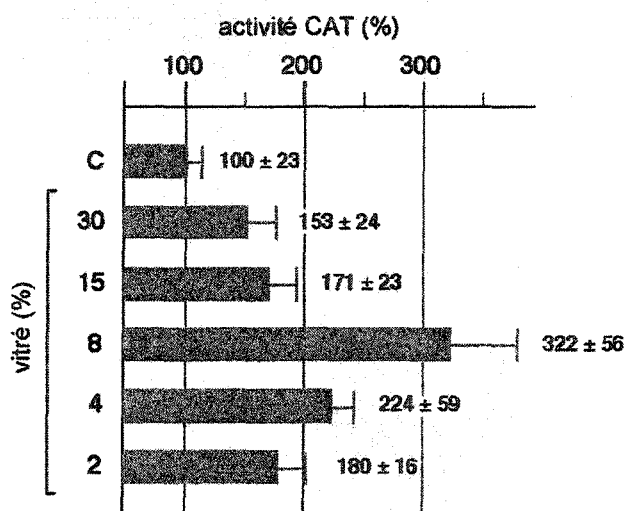


Figure 6.5 : Effet du vitré sur l'activité du promoteur $\alpha 5$. Des cellules de l'EPR non-confluentes ont été transfectées à l'aide du plasmide -954 $\alpha 5$ CAT Δ MCS en absence (C, contrôle) ou en présence de différentes concentrations de vitré.

La prochaine étape consistera à réaliser une série de transfections transitoires à cette concentration de vitré à l'aide de tous les plasmides $\alpha 5\Delta$ MCS. Ces résultats nous permettront d'identifier les régions du promoteur $\alpha 5$ nécessaires à la transmission de l'influence positive du vitré. Il serait aussi intéressant d'évaluer les niveaux des facteurs de transcription qui lient les régions du promoteur $\alpha 5$ selon que les cultures sont exposées ou non au vitré.

Il faudra ensuite déterminer quels facteurs de transcription sont impliqués dans ce processus et quel composé du vitré exerce cette influence sur l'activité du promoteur $\alpha 5$.

6.2.2.3 Influence de la fibronectine

Comme précédemment expliqué à la section 1.6, il a été démontré que la fibronectine était fortement exprimée dans les membranes épirétiniennes (137-140). Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet de la fibronectine sur l'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$. Larouche et al. (143) ont démontré une forte stimulation de l'activité du promoteur $\alpha 5$ dans des cellules épithéliales de cornée cultivées en présence de fibronectine. Ils ont aussi identifié une séquence située entre les positions -61 et -77 pb du promoteur $\alpha 5$ qui assure la médiation de la réponse à la fibronectine, et ont démontré que le facteur de transcription positif Sp1 liait cette séquence. Des études similaires pourraient être effectuées avec les cellules de l'EPR afin d'évaluer l'influence de la fibronectine sur l'activité du promoteur $\alpha 5$. Il serait aussi intéressant d'évaluer l'effet de la fibronectine sur l'expression de la protéine $\alpha 5$ et sur la migration et la prolifération des cellules de l'EPR.

6.3 CHAPITRE 5 : EXPRESSION DE LA SOUS-UNITÉ $\alpha 4$ PAR LES CELLULES DE L'EPR

6.3.1 Récapitulation des résultats et discussion

Comme précédemment démontré dans la littérature (149,178), nous avons démontré l'expression de la sous-unité $\alpha 4$ *in situ* dans les cellules de l'EPR de rétines humaines. Le marquage fut observé sur toute la surface des cellules et un marquage un peu plus intense fut retrouvé sur la face apicale des cellules (Figure 5.1A).

Contrairement à ce qui avait été rapporté dans l'étude de Hunt et al. (146), nous avons démontré que la sous-unité $\alpha 4$ était présente sur les cellules de l'EPR en culture, et ce, à différents stades de confluence (Figure 5.1C et D). Le marquage fut observé en bordure des cellules. Nous avons réalisé plusieurs essais afin d'immunoprécipiter la sous-unité $\alpha 4$ solubilisée à partir de ces cellules afin de quantifier la protéine aux différents stades de confluence, mais n'avons malheureusement pas réussi. Plusieurs anticorps dirigés contre la sous-unité $\alpha 4$ ont été utilisés mais n'ont généré aucun résultat en immunoprécipitation ainsi qu'en immunobuvardage de type Western. Très peu de chercheurs ont réussi à immunoprécipiter la sous-unité $\alpha 4$ (243,244), et ceux qui ont réussi l'ont fait sur des fibroblastes (243), cellules qui expriment fortement cette protéine ou sur des cellules où l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ a été surexprimée de façon ectopique (244). D'après nos résultats en immunofluorescence, en RT-PCR semi-quantitatif et en transfections transitoires, il semble que les cellules de l'EPR n'expriment pas très fortement la sous-unité $\alpha 4$. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas été en mesure de la détecter par immunoprécipitation ou par immunobuvardage de type Western.

Les résultats des analyses de RT-PCR semi-quantitatif ont démontré que les niveaux de transcrit $\alpha 4$ variaient selon le niveau de confluence (Figure 5.2A). Les cellules non-confluentes démontrent le plus haut niveau de transcrit, ce niveau diminuant avec l'augmentation de la confluence. Ces résultats sont les premiers qui démontrent que l'augmentation de la confluence affecte le niveau de transcription du gène $\alpha 4$ chez les cellules de l'EPR.

Les résultats de transfections transitoires ont démontré une forte augmentation de l'activité du promoteur $\alpha 4$, soit une augmentation de 4.1 et 4.5 fois, entre les positions -42 et -76 pb pour les cellules non-confluentes et confluentes, démontrant ainsi la présence d'éléments de régulation positive entre ces deux positions (Figure 5.2B). Le plasmide -76 $\alpha 4$ CAT est d'ailleurs

celui qui possède la plus forte activité promotrice. Un allongement en 5' jusqu'à la position -120 résulte en une importante diminution de l'activité du promoteur. L'activité du promoteur $\alpha 4$ est très faible pour le plasmide -1000 $\alpha 4$ CAT, soit 18 et 13 fois plus faible comparativement à l'activité dirigée par le plasmide -76 $\alpha 4$ CAT respectivement pour les cellules non-confluentes et confluentes. Il n'y a pas de différence significative dans l'activité du promoteur $\alpha 4$ entre les cellules non-confluentes et confluentes.

Nous avons aussi effectué des transfections transitoires à l'aide des plasmides -200 $\alpha 4$ CAT, -300 $\alpha 4$ CAT, -400 $\alpha 4$ CAT, -600 $\alpha 4$ CAT et -800 $\alpha 4$ CAT, résultats qui n'ont pas été insérés dans le manuscrit du chapitre 5 puisqu'ils ont été effectués seulement sur des cellules non-confluentes (Figure 6.5). Ces résultats démontrent qu'une autre réduction importante est observée entre -200 et -300 pb. L'activité du promoteur demeure stable entre -400 et -800pb. On note ensuite une diminution de l'ordre de 6.1 fois entre les positions -800 et -1000 pb.

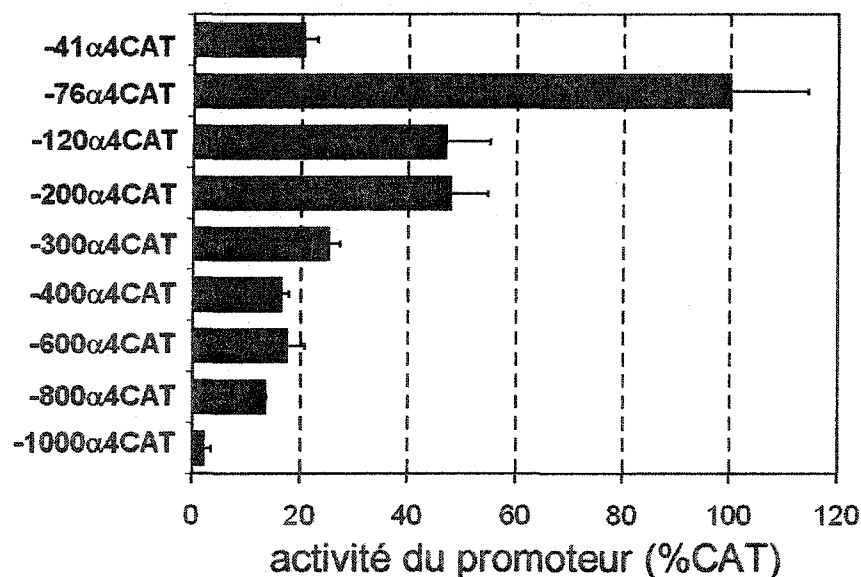


FIGURE 6.6 : Activité du promoteur $\alpha 4$ dans des cellules de l'EPR non-confluentes.

Cette forte augmentation de l'activité du promoteur $\alpha 4$ entre les positions -42 et -76 pb est aussi retrouvée sur plusieurs lignées cellulaires testées (180-182). Par contre, on retrouve avec les cellules de l'EPR une région de forte répression entre les positions -76 et -120 qui n'est pas retrouvée chez les autres cellules testées (180-182), suggérant que le segment -76/-120 porte des éléments de régulation négatifs fonctionnels uniquement chez l'EPR. Aucun site de liaison "potentiel" de protéines nucléaires connues n'a été identifié dans cette région (179). Les résultats des transfections de Postigo et al. (182) démontrent aussi que les lignées exprimant $\alpha 4$ à la surface cellulaire ont une forte activité promotrice entre -76 et -2000 pb. Par contre, la région -300/-400 agirait en tant que répresseur puissant dans les lignées cellulaires n'exprimant pas la protéine $\alpha 4$ à leur surface. Chez l'EPR non-confluent, nous retrouvons une forte répression chez le segment -200/-300 pb (Figure 6.5). L'allongement du promoteur $\alpha 4$ jusqu'à la position -1000 se traduit par une extinction presque complète de l'activité $\alpha 4$ dans les cellules de l'EPR. Bien que ces résultats démontrent que la régulation d'un même gène varie entre les différents types de cellules, ces résultats suggèrent que les cellules de l'EPR montrent un profil de cellules possédant une faible expression de la sous-unité $\alpha 4$. C'est peut-être pour cette raison que la détection de la protéine $\alpha 4$ par immunoprécipitation ou par immunobuvardage de type Western n'a pas fonctionné.

6.3.2 Perspectives de recherche

Tout comme l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est aussi un récepteur de la fibronectine, et puisque la fibronectine est fortement exprimée dans les membranes épirétiniennes (137-140), un dérèglement dans l'expression de cette intégrine pourrait donc jouer un rôle dans la vitréorétinopathie proliférante. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet de la fibronectine sur l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. Étant donné qu'il est difficile de détecter cette protéine par immunoprécipitation ou par immunobuvardage de type Western, nous pourrions tenter de la détecter par cytométrie de flux. Des transfections transitoires en

présence et en absence de fibronectine pourraient aussi être réalisées afin d'identifier les régions importantes pour la régulation du promoteur $\alpha 4$. Il serait aussi intéressant d'évaluer les niveaux des éléments régulateurs du promoteur $\alpha 4$ en présence et en absence de fibronectine.

CHAPITRE 7

BIBLIOGRAPHIE

1. Stephens, A. et Lowe, J. (1997) "L'oeil" *In* Histologie humaine, Stephens, A., Lowe, J., éditeur(s), DeBoeck University Press, Paris, Bruxelles, pp. 383-395.
2. Morin, Y. (1996) "Larousse Médical", Larousse, Paris.
3. Hubel, D. (1994) "L'oeil, le cerveau et la vision: les étapes cérébrales du traitement visuel", Pour la science Diffusion Belin, Paris.
4. Darnell, J., Lodish, H. et Baltimore, D. (1993) "Neurones et propriétés électriques des membranes cellulaires." *In* Biologie moléculaire de la cellule, François, C., éditeur(s), De Boeck Université, Bruxelles, pp. 804.
5. Newman, E. et Reichenbach, A. (1996) "The Muller cell: a functional element of the retina", Trends Neurosci 19: 307-312.
6. DiLoreto, D. A., Jr., Martzen, M. R., del Cerro, C., Coleman, P. D. et del Cerro, M. (1995) "Muller cell changes precede photoreceptor cell degeneration in the age-related retinal degeneration of the Fischer 344 rat", Brain Res 698: 1-14.
7. Dubois-Dauphin, M., Poitry-Yamate, C., de Bilbao, F., Julliard, A. K., Jourdan, F., et al. (2000) "Early postnatal Muller cell death leads to retinal but not optic nerve degeneration in NSE-Hu-Bcl-2 transgenic mice", Neuroscience 95: 9-21.
8. Li, C. M., Yan, R. T. et Wang, S. Z. (2001) "Atrophy of Muller glia and photoreceptor cells in chick retina misexpressing cNSCL2", Invest Ophthalmol Vis Sci 42: 3103-3109.
9. Olive, J. (1980) "The structural organization of mammalian retinal disk membrane", Int Rev Cytol 64: 107-169.

10. Salesse, C., Boucher, F. et Leblanc, R. M. (1984) "An evaluation of purity criteria for bovine rod outer segment membranes", *Anal Biochem* 142: 258-266.
11. Djamgoz, M. B. A., Archer, S. N. et Vallegra, S. (1995) "Neurobiology and clinical aspects of the outer retina." Chapman and Hall, London.
12. Marmor, M. F. (1998) "Structure, function and disease of the retinal pigment epithelium" *In* The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 3-9.
13. Burnside, B. et Bost-Usinger, L. (1998) "The retinal pigment epithelium cytoskeleton" *In* The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 41-67.
14. Rodriguez-Boulan, E. et Nelson, W. J. (1989) "Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype", *Science* 245: 718-725.
15. Clark, V. M. (1986) "The cell biology of the retinal pigment epithelium" *In* Cellular biology: a series, The retina, a model for cell biology studies, Adler, R., Farber, D., éditeur(s), Academic Press inc., Orlando, pp. 129-167.
16. Boulton, M. (1998) "Melanin and the retinal pigment epithelium" *In* The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 68-85.
17. Hong, L., Liu, Y. et Simon, J. D. (2004) "Binding of Metal Ions to Melanin and Their Effects on the Aerobic Reactivity", *Photochem Photobiol*

18. Sarna, T. (1992) "Properties and function of the ocular melanin--a photobiophysical view", *J Photochem Photobiol B* 12: 215-258.
19. Larsson, B. et Tjalve, H. (1979) "Studies on the mechanism of drug-binding to melanin", *Biochem Pharmacol* 28: 1181-1187.
20. Ings, R. M. (1984) "The melanin binding of drugs and its implications", *Drug Metab Rev* 15: 1183-1212.
21. Koneru, P. B., Lien, E. J. et Koda, R. T. (1986) "Oculotoxicities of systemically administered drugs", *J Ocul Pharmacol* 2: 385-404.
22. Persad, S., Menon, I. A., Basu, P. K. et Carre, F. (1988) "Phototoxicity of chlorpromazine on retinal pigment epithelial cells", *Curr Eye Res* 7: 1-9.
23. Shakib, M., Rutkowski, P. et Wise, G. N. (1972) "Fluorescein angiography and the retinal pigment epithelium", *Am J Ophthalmol* 74: 206-218.
24. Citi, S. (1993) "The molecular organization of tight junctions", *J Cell Biol* 121: 485-489.
25. Nguyen-Legros, J. (1978) "Fine structure of the pigment epithelium in the vertebrate retina", *Int Rev Cytol Suppl* 287-328.
26. Schwarz, M. A., Owaribe, K., Kartenbeck, J. et Franke, W. W. (1990) "Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components", *Annu Rev Cell Biol* 6: 461-491.
27. Peyman, G. A. et Bok, D. (1972) "Peroxidase diffusion in the normal and laser-coagulated primate retina", *Invest Ophthalmol* 11: 35-45.

28. Owaribe, K., Kartenbeck, J., Rungger-Brandle, E. et Franke, W. W. (1988) "Cytoskeletons of retinal pigment epithelial cells: interspecies differences of expression patterns indicate independence of cell function from the specific complement of cytoskeletal proteins", *Cell Tissue Res* 254: 301-315.
29. Hudspeth, A. J. et Yee, A. G. (1973) "The intercellular junctional complexes of retinal pigment epithelia", *Invest Ophthalmol* 12: 354-365.
30. Marshall, J., Hussain, A. A., Starita, C., Moore, D. J. et Patmore, A. L. (1998) "Aging and Bruch's membrane" *In The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease*, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 669-692.
31. Remé, C. E., Hafezi, F., Marti, A., Munz, K. et Reinboth, J. J. (1998) "Light damage to retina and retinal pigment epithelium" *In The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease*, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 563-586.
32. Bok, D. et Young, R. W. (1979) "Phagocytic properties of the retinal pigment epithelium" *In The Retinal Pigment Epithelium*, Marmor, M. F., Zinn, K. M., éditeur(s), Harvard University Press, Cambridge, MA, pp. 148-174.
33. Besharse, J. C. et Defoe, D. M. (1998) "Role of the retinal pigment epithelium in photoreceptor membrane turnover" *In The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease*, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 152-172.
34. Young, R. W. et Bok, D. (1969) "Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process", *J Cell Biol* 42: 392-403.

35. Hogan, M. J., Wood, I. et Steinberg, R. H. (1974) "Phagocytosis by pigment epithelium of human retinal cones", *Nature* 252: 305-307.
36. Eldred, G. E., Miller, G. V., Stark, W. S. et Feeney-Burns, L. (1982) "Lipofuscin: resolution of discrepant fluorescence data", *Science* 216: 757-759.
37. Eldred, G. E. et Katz, M. L. (1988) "Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization", *Exp Eye Res* 47: 71-86.
38. Eldred, G. E. et Katz, M. L. (1991) "The lipid peroxidation theory of lipofuscinogenesis cannot yet be confirmed", *Free Radic Biol Med* 10: 445-447.
39. Marmorstein, A. D., Marmorstein, L. Y., Sakaguchi, H. et Hollyfield, J. G. (2002) "Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, Bruch's Membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2435-2441.
40. Eldred, G. E. (1998) "Lipofuscin and other lysosomal storage deposits in the retinal pigment epithelium" *In The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease*, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 651-668.
41. Chader, G. J., Pepperberg, D. R., Crouch, R. et Wiggert, B. (1998) "Retinoids and the retinal pigment epithelium" *In The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease*, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 135-151.
42. Campochiaro, P. A. (1998) "Growth factors in the retinal pigment epithelium and retina" *In The Retinal Pigment Epithelium: Function and*

Disease, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 459-477.

43. Steinberg, R. H. et Miller, S. (1973) "Aspects of electrolyte transport in frog pigment epithelium", *Exp Eye Res* 16: 365-372.
44. Miller, S. S. et Steinberg, R. H. (1977) "Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium", *J Membr Biol* 36: 337-372.
45. Hughes, B. A., Miller, S. S. et Machen, T. E. (1984) "Effects of cyclic AMP on fluid absorption and ion transport across frog retinal pigment epithelium. Measurements in the open-circuit state", *J Gen Physiol* 83: 875-899.
46. Adorante, J. S. et Miller, S. S. (1990) "Potassium-dependent volume regulation in retinal pigment epithelium is mediated by Na,K,Cl cotransport", *J Gen Physiol* 96: 1153-1176.
47. Kenyon, E., Yu, K., La Cour, M. et Miller, S. S. (1994) "Lactate transport mechanisms at apical and basolateral membranes of bovine retinal pigment epithelium", *Am J Physiol* 267: C1561-1573.
48. Bialek, S. et Miller, S. S. (1994) "K⁺ and Cl⁻ transport mechanisms in bovine pigment epithelium that could modulate subretinal space volume and composition", *J Physiol* 475: 401-417.
49. Hughes, B. A., Gallemore, R. P. et Miller, S. S. (1998) "Transport mechanisms in the retinal pigment epithelium" *In The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease*, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 103-134.
50. Marmor, M. F. (1998) "Mechanisms of retinal adhesiveness" *In The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease*, Marmor, M. F.,

Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 392-405.

51. Hageman, G. S. et Kuehn, M. H. (1998) "Biology of the interphotoreceptor matrix-retinal pigment epithelium-retina interface" *In* The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease, Marmor, M. F., Wolfensberger, T. J., éditeur(s), Oxford University Press, New York, pp. 361-391.
52. Suzuki, S. T. (1996) "Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway?" *J Cell Biochem* 61: 531-542.
53. Takeichi, M. (1995) "Morphogenetic roles of classic cadherins", *Curr Opin Cell Biol* 7: 619-627.
54. Cowin, P. et Burke, B. (1996) "Cytoskeleton-membrane interactions", *Curr Opin Cell Biol* 8: 56-65.
55. Takeichi, M. (1991) "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator", *Science* 251: 1451-1455.
56. Behrens, J. (1994) "Cadherins as determinants of tissue morphology and suppressors of invasion", *Acta Anat (Basel)* 149: 165-169.
57. McNeill, H., Ozawa, M., Kemler, R. et Nelson, W. J. (1990) "Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity", *Cell* 62: 309-316.
58. Marrs, J. A., Napolitano, E. W., Murphy-Erdosh, C., Mays, R. W., Reichardt, L. F., et al. (1993) "Distinguishing roles of the membrane-cytoskeleton and cadherin mediated cell-cell adhesion in generating

different Na⁺,K⁺-ATPase distributions in polarized epithelia", *J Cell Biol* 123: 149-164.

59. Marrs, J. A., Andersson-Fisone, C., Jeong, M. C., Cohen-Gould, L., Zurzolo, C., et al. (1995) "Plasticity in epithelial cell phenotype: modulation by expression of different cadherin cell adhesion molecules", *J Cell Biol* 129: 507-519.
60. Lagunowich, L. A. et Grunwald, G. B. (1989) "Expression of calcium-dependent cell adhesion during ocular development: a biochemical, histochemical and functional analysis", *Dev Biol* 135: 158-171.
61. Lagunowich, L. A. et Grunwald, G. B. (1991) "Tissue and age-specificity of post-translational modifications of N-cadherin during chick embryo development", *Differentiation* 47: 19-27.
62. McKay, B. S., Irving, P. E., Skumatz, C. M. et Burke, J. M. (1997) "Cell-cell adhesion molecules and the development of an epithelial phenotype in cultured human retinal pigment epithelial cells", *Exp Eye Res* 65: 661-671.
63. Rosen, S. D. et Bertozzi, C. R. (1994) "The selectins and their ligands", *Curr Opin Cell Biol* 6: 663-673.
64. Lasky, L. A. (1995) "Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response", *Annu Rev Biochem* 64: 113-139.
65. Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A. et Engel, P. (1995) "The selectins: vascular adhesion molecules", *Faseb J* 9: 866-873.

66. Richardson, P. R., Boulton, M. E., Duvall-Young, J. et McLeod, D. (1996) "Immunocytochemical study of retinal diode laser photocoagulation in the rat", *Br J Ophthalmol* 80: 1092-1098.
67. Shen, W. Y., Yu, M. J., Barry, C. J., Constable, I. J. et Rakoczy, P. E. (1998) "Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularisation in the rat", *Br J Ophthalmol* 82: 1063-1071.
68. Yeh, D. C., Bula, D. V., Miller, J. W., Gragoudas, E. S. et Arroyo, J. G. (2004) "Expression of leukocyte adhesion molecules in human subfoveal choroidal neovascular membranes treated with and without photodynamic therapy", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 2368-2373.
69. Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. et Prescott, S. M. (1996) "Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions", *J Clin Invest* 98: 1699-1702.
70. Vaughn, D. E. et Bjorkman, P. J. (1996) "The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules", *Neuron* 16: 261-273.
71. Baldwin, T. J., Fazeli, M. S., Doherty, P. et Walsh, F. S. (1996) "Elucidation of the molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules", *J Cell Biochem* 61: 502-513.
72. Tessier-Lavigne, M. et Goodman, C. S. (1996) "The molecular biology of axon guidance", *Science* 274: 1123-1133.
73. Dustin, M. L. et Springer, T. A. (1991) "Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion", *Annu Rev Immunol* 9: 27-66.

74. Rosales, C. et Juliano, R. L. (1995) "Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes", *J Leukoc Biol* 57: 189-198.
75. Springer, T. A. (1995) "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration", *Annu Rev Physiol* 57: 827-872.
76. Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., et al. (1989) "Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes", *Cell* 59: 1203-1211.
77. Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., et al. (1990) "VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site", *Cell* 60: 577-584.
78. Finnemann, S. C., Marmorstein, A. D., Neill, J. M. et Rodriguez-Boulan, E. (1997) "Identification of the retinal pigment epithelium protein RET-PE2 as CE-9/OX-47, a member of the immunoglobulin superfamily", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2366-2374.
79. Rizzolo, L. J. et Zhou, S. (1995) "The distribution of Na⁺,K⁺-ATPase and 5A11 antigen in apical microvilli of the retinal pigment epithelium is unrelated to alpha-spectrin", *J Cell Sci* 108 (Pt 11): 3623-3633.
80. Deora, A. A., Gravotta, D., Kreitzer, G., Hu, J., Bok, D., et al. (2004) "The Basolateral Targeting Signal of CD147 (EMMPRIN) Consists of a Single Leucine and Is Not Recognized by Retinal Pigment Epithelium", *Mol Biol Cell*

81. Aota, S. et Yamada, K. M. (1995) "Fibronectin and cell adhesion: specificity of integrin-ligand interaction", *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 70: 1-21.
82. Bosman, F. T. (1993) "Integrins: cell adhesives and modulators of cell function", *Histochem J* 25: 469-477.
83. Cheresh, D. A., Mecham, R. P. et Meacham, R. P. (1994) "Integrins: Molecular and biological responses to the extracellular matrix", Academic Press, San Diego.
84. Clegg, D. O., Mullick, L. H., Wingerd, K. L., Lin, H., Atienza, J. W., et al. (2000) "Adhesive events in retinal development and function: the role of integrin receptors", *Results Probl Cell Differ* 31: 141-156.
85. Cox, D., Aoki, T., Seki, J., Motoyama, Y. et Yoshida, K. (1994) "The pharmacology of the integrins", *Med Res Rev* 14: 195-228.
86. Delcommenne, M. et Streuli, C. H. (1995) "Control of integrin expression by extracellular matrix", *J Biol Chem* 270: 26794-26801.
87. Elner, S. G. et Elner, V. M. (1996) "The integrin superfamily and the eye", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 696-701.
88. Hynes, R. O. (1987) "Integrins: A family of cell surface receptors", *Cell* 48: 549-554.
89. Hynes, R. O. (1992) "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion", *Cell* 69: 11-25.
90. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. et Smith, J. W. (2000) "Ligand binding to integrins", *J Biol Chem* 275: 21785-21788.

91. Ruoslahti, E. et Pierschbacher, M. D. (1987) "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins", *Science* 238: 491-497.
92. Wehrle-Haller, B. et Imhof, B. A. (2003) "Integrin-dependent pathologies", *J Pathol* 200: 481-487.
93. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., et al. (2001) "The sequence of the human genome", *Science* 291: 1304-1351.
94. Gahmberg, C. G., Tolvanen, M. et Kotovuori, P. (1997) "Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands", *Eur J Biochem* 245: 215-232.
95. Arnaout, M. A. (1990) "Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18", *Blood* 75: 1037-1050.
96. Kumar, C. C. (2003) "Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis", *Curr Drug Targets* 4: 123-131.
97. Briskin, M., Winsor-Hines, D., Shyjan, A., Cochran, N., Bloom, S., et al. (1997) "Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue", *Am J Pathol* 151: 97-110.
98. Shyjan, A. M., Bertagnolli, M., Kenney, C. J. et Briskin, M. J. (1996) "Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) demonstrates structural and functional similarities to the alpha 4 beta 7-integrin binding domains of murine MAdCAM-1, but extreme divergence of mucin-like sequences", *J Immunol* 156: 2851-2857.
99. Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Kilshaw, P. J., et al. (1993) "Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1", *Cell* 74: 185-185.

100. Rott, L. S., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Berg, E. L. et Butcher, E. C. (1996) "A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with beta 7 integrins and memory differentiation", *J Immunol* 156: 3727-3736.
101. Russell, G. J., Parker, C. M., Cepek, K. L., Mandelbrot, D. A., Sood, A., et al. (1994) "Distinct structural and functional epitopes of the alpha E beta 7 integrin", *Eur J Immunol* 24: 2832-2841.
102. Cepek, K. L., Parker, C. M., Madara, J. L. et Brenner, M. B. (1993) "Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells", *J Immunol* 150: 3459-3470.
103. Kintscher, U., Lyon, C., Wakino, S., Bruemmer, D., Feng, X., et al. (2002) "PPARalpha inhibits TGF-beta-induced beta5 integrin transcription in vascular smooth muscle cells by interacting with Smad4", *Circ Res* 91: e35-44.
104. Bello, L., Francolini, M., Marthyn, P., Zhang, J., Carroll, R. S., et al. (2001) "Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery", *Neurosurgery* 49: 380-389; discussion 390.
105. Finnemann, S. C., Bonilha, V. L., Marmorstein, A. D. et Rodriguez-Boulan, E. (1997) "Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization", *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12932-12937.
106. Lin, H. et Clegg, D. O. (1998) "Integrin alphavbeta5 participates in the binding of photoreceptor rod outer segments during phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1703-1712.

107. Finnemann, S. C. et Rodriguez-Boulan, E. (1999) "Macrophage and retinal pigment epithelium phagocytosis: Apoptotic cells and photoreceptors compete for alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrins, and protein kinase C regulates alpha v beta 5 binding and cytoskeletal linkage", *Journal of Experimental Medicine* 190: 861-874.
108. Finnemann, S. C. et Silverstein, R. L. (2001) "Differential roles of CD36 and alphavbeta5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium", *J Exp Med* 194: 1289-1298.
109. Hall, M. O., Abrams, T. A. et Burgess, B. L. (2003) "Integrin alphavbeta5 is not required for the phagocytosis of photoreceptor outer segments by cultured retinal pigment epithelial cells", *Exp Eye Res* 77: 281-286.
110. Site web: <http://ntri.tamuk.edu/homepage-ntri/lectures/protein/junction1.html> (novembre 2003)
111. Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., et al. (2001) "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3", *Science* 294: 339-345.
112. Humphries, M. J. (1996) "Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction", *Curr Opin Cell Biol* 8: 632-640.
113. Garcia, A. J., Takagi, J. et Boettiger, D. (1998) "Two-stage activation for alpha5beta1 integrin binding to surface-adsorbed fibronectin", *J Biol Chem* 273: 34710-34715.
114. Yamada, K. M. (1997) "Integrin signaling", *Matrix Biol* 16: 137-141.

115. Takagi, J., Erickson, H. P. et Springer, T. A. (2001) "C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin $\alpha 5 \beta 1$ ", *Nat Struct Biol* 8: 412-416.
116. Mould, A. P., Akiyama, S. K. et Humphries, M. J. (1995) "Regulation of integrin $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} ", *J Biol Chem* 270: 26270-26277.
117. D'Souza, S. E., Haas, T. A., Piotrowicz, R. S., Byers-Ward, V., McGrath, D. E., et al. (1994) "Ligand and cation binding are dual functions of a discrete segment of the integrin $\beta 3$ subunit: cation displacement is involved in ligand binding", *Cell* 79: 659-667.
118. Hynes, R. O. (1990) "Fibronectins", Springer Verlag, New York.
119. Pankov, R. et Yamada, K. M. (2002) "Fibronectin at a glance", *J Cell Sci* 115: 3861-3863.
120. French-Constant, C. (1995) "Alternative splicing of fibronectin—many different proteins but few different functions", *Exp Cell Res* 221: 261-271.
121. Kosmehl, H., Berndt, A. et Katenkamp, D. (1996) "Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects", *Virchows Arch* 429: 311-322.
122. Smith, J. W., Ruggeri, Z. M., Kunicki, T. J. et Cheresh, D. A. (1990) "Interaction of integrins $\alpha v \beta 3$ and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. Differential peptide recognition accounts for distinct binding sites", *J Biol Chem* 265: 12267-12271.

123. Koivunen, E., Gay, D. A. et Ruoslahti, E. (1993) "Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library", *J Biol Chem* 268: 20205-20210.
124. Akiyama, S. K. et Yamada, K. M. (1985) "Synthetic peptides competitively inhibit both direct binding to fibroblasts and functional biological assays for the purified cell-binding domain of fibronectin", *J Biol Chem* 260: 10402-10405.
125. Johansson, S., Forsberg, E. et Lundgren, B. (1987) "Comparison of fibronectin receptors from rat hepatocytes and fibroblasts", *J Biol Chem* 262: 7819-7824.
126. Akiyama, S. K., Aota, S. et Yamada, K. M. (1995) "Function and receptor specificity of a minimal 20 kilodalton cell adhesive fragment of fibronectin", *Cell Adhes Commun* 3: 13-25.
127. Campochiaro, P. A., Jerdan, J. A. et Glaser, B. M. (1986) "The Extracellular Matrix of Human Retinal Pigment Epithelial Cells In Vivo and its Synthesis In Vitro", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1615-1621.
128. Kohno, T., Sorgente, N., Patterson, R. et Ryan, S. J. (1983) "Fibronectin and laminin distribution in bovine eye", *Jpn J Ophthalmol* 27: 496-505.
129. Kohno, T., Sorgente, N., Ishibashi, T., Goodnight, R. et Ryan, S. J. (1987) "Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 506-514.
130. Roy, S., Cagliero, E. et Lorenzi, M. (1996) "Fibronectin overexpression in retinal microvessels of patients with diabetes", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 258-266.

131. Chakrabarti, S., Khan, Z. A., Cukiernik, M., Zhang, W. et Sima, A. A. (2004) "C-peptide and retinal microangiopathy in diabetes", *Exp Diabetes Res* 5: 91-96.
132. Hirsch, S. et Bahr, M. (1999) "Immunocytochemical characterization of reactive optic nerve astrocytes and meningeal cells", *Glia* 26: 36-46.
133. Machemer, R. et Laqua, H. (1975) "Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation)", *Am J Ophthalmol* 80: 1-23.
134. Machemer, R., van Horn, D. et Aaberg, T. M. (1978) "Pigment epithelial proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation", *Am J Ophthalmol* 85: 181-191.
135. Glaser, B. M., Cardin, A. et Biscoe, B. (1987) "Proliferative vitreoretinopathy. The mechanism of development of vitreoretinal traction", *Ophthalmology* 94: 327-332.
136. Glaser, B. M. et Lemor, M. (1994) "Pathobiology of proliferative vitreoretinopathy" *In Retina*, Ryan, S. J., éditeur(s), Mosby, St. Louis, MO, USA, pp. 2249-2263.
137. Yeo, J. H., Sadeghi, J., Campochiaro, P. A., Green, W. R. et Glaser, B. M. (1986) "Intravitreal fibronectin and platelet-derived growth factor. New model for traction retinal detachment", *Arch Ophthalmol* 104: 417-421.
138. Sramek, S. J., Wallow, I. H., Stevens, T. S. et Nork, T. M. (1989) "Immunostaining of preretinal membranes for actin, fibronectin, and glial fibrillary acidic protein", *Ophthalmology* 96: 835-841.

139. Morino, I., Hiscott, P., McKechnie, N. et Grierson, I. (1990) "Variation in epiretinal membrane components with clinical duration of the proliferative tissue", *Br J Ophthalmol* 74: 393-399.
140. Immonen, I., Tervo, K., Virtanen, I., Laatikainen, L. et Tervo, T. (1991) "Immunohistochemical demonstration of cellular fibronectin and tenascin in human epiretinal membranes", *Acta Ophthalmol (Copenh)* 69: 466-471.
141. Hiscott, P., Waller, H. A., Grierson, I., Butler, M. G., Scott, D. L., et al. (1992) "Fibronectin synthesis in subretinal membranes of proliferative vitreoretinopathy", *Br J Ophthalmol* 76: 486-490.
142. Goldschild, M. et Baudouin, C. (1997) "[Role of integrins in ocular physiology and diseases]", *J Fr Ophtalmol* 20: 311-325.
143. Larouche, K., Leclerc, S., Salesse, C. et Guerin, S. L. (2000) "Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro", *J Biol Chem* 275: 39182-39192.
144. Huang, S. et Chakrabarty, S. (1994) "Regulation of fibronectin and laminin receptor expression, fibronectin and laminin secretion in human colon cancer cells by transforming growth factor-beta 1", *Int J Cancer* 57: 742-746.
145. Kupper, T. S. et Ferguson, T. A. (1993) "A potential pathophysiologic role for alpha 2 beta 1 integrin in human eye diseases involving vitreoretinal traction", *Faseb J* 7: 1401-1406.

146. Hunt, R. C., Pakalnis, V. A., Choudhury, P. et Black, E. P. (1994)
"Cytokines and serum cause alpha 2 beta 1 integrin-mediated contraction
of collagen gels by cultured retinal pigment epithelial cells", *Invest
Ophthalmol Vis Sci* 35: 955-963.
147. Robbins, S. G., Brem, R. B., Wilson, D. J., O'Rourke, L. M., Robertson, J.
E., et al. (1994) "Immunolocalization of integrins in proliferative retinal
membranes", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3475-3485.
148. Yang, C. H., Huang, T. F., Liu, K. R., Chen, M. S. et Hung, P. T. (1996)
"Inhibition of cell-induced vitreous contraction by synthetic peptide
derived from the collagen receptor binding sequence", *J Ocul Pharmacol
Ther* 12: 353-361.
149. Brem, R. B., Robbins, S. G., Wilson, D. J., O'Rourke, L. M., Mixon, R. N.,
et al. (1994) "Immunolocalization of integrins in the human retina", *Invest
Ophthalmol Vis Sci* 35: 3466-3474.
150. Hemler, M. E., Elices, M. J., Parker, C. et Takada, Y. (1990) "Structure of
the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions",
Immunol Rev 114: 45-65.
151. Liao, Y. F., Gotwals, P. J., Koteliansky, V. E., Sheppard, D. et Van De
Water, L. (2002) "The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins
alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 providing a novel mechanism for
regulating cell adhesion by alternative splicing", *J Biol Chem* 277: 14467-
14474.
152. Miyake, K., Weissman, I. L., Greenberger, J. S. et Kincade, P. W. (1991)
"Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis", *J Exp
Med* 173: 599-607.

153. Roldan, E., Garcia-Pardo, A. et Brieva, J. A. (1992) "VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion", *J Exp Med* 175: 1739-1747.
154. Teixido, J., Hemler, M. E., Greenberger, J. S. et Anklesaria, P. (1992) "Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma", *J Clin Invest* 90: 358-367.
155. Sanchez, M. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Fernandez, E., Leonardo, E., Lozano, J., et al. (1993) "Putative prethymic T cell precursors within the early human embryonic liver: a molecular and functional analysis", *J Exp Med* 177: 19-33.
156. Hamamura, K., Matsuda, H., Takeuchi, Y., Habu, S., Yagita, H., et al. (1996) "A critical role of VLA-4 in erythropoiesis in vivo", *Blood* 87: 2513-2517.
157. Lobb, R. R. et Hemler, M. E. (1994) "The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo", *J Clin Invest* 94: 1722-1728.
158. Striz, I. et Costabel, U. (1992) "The role of integrins in the immune response", *Sarcoidosis* 9: 88-94.
159. Laffon, A., Garcia-Vicuna, R., Humbria, A., Postigo, A. A., Corbi, A. L., et al. (1991) "Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis", *J Clin Invest* 88: 546-552.
160. Cybulsky, M. I. et Gimbrone, M. A., Jr. (1991) "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis", *Science* 251: 788-791.

161. Site web: <http://www.bioportfolio.com/leaddiscovery/pubmed-050216.htm>
(novembre 2003)
162. Kudlacz, E., Whitney, C., Andresen, C., Duplantier, A., Beckius, G., et al.
(2002) "Pulmonary eosinophilia in a murine model of allergic
inflammation is attenuated by small molecule alpha4beta1 antagonists",
J Pharmacol Exp Ther 301: 747-752.
163. Gailit, J., Pierschbacher, M. et Clark, R. A. (1993) "Expression of
functional alpha 4 beta 1 integrin by human dermal fibroblasts", J Invest
Dermatol 100: 323-328.
164. Kwee, L., Baldwin, H. S., Shen, H. M., Stewart, C. L., Buck, C., et al.
(1995) "Defective development of the embryonic and extraembryonic
circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1)
deficient mice", Development 121: 489-503.
165. Yang, J. T., Rayburn, H. et Hynes, R. O. (1995) "Cell adhesion events
mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac
development", Development 121: 549-560.
166. Lauweryns, B., van den Oord, J. J., Volpes, R., Foets, B. et Missotten, L.
(1991) "Distribution of very late activation integrins in the human cornea.
An immunohistochemical study using monoclonal antibodies", Invest
Ophthalmol Vis Sci 32: 2079-2085.
167. Rosen, G. D., Sanes, J. R., LaChance, R., Cunningham, J. M., Roman,
J., et al. (1992) "Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor
VCAM-1 in myogenesis", Cell 69: 1107-1119.

168. Sheppard, A. M., Onken, M. D., Rosen, G. D., Noakes, P. G. et Dean, D. C. (1994) "Expanding roles for alpha 4 integrin and its ligands in development", *Cell Adhes Commun* 2: 27-43.
169. Yednock, T. A., Cannon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., et al. (1992) "Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin", *Nature* 356: 63-66.
170. Kil, S. H., Krull, C. E., Cann, G., Clegg, D. et Bronner-Fraser, M. (1998) "The alpha4 subunit of integrin is important for neural crest cell migration", *Dev Biol* 202: 29-42.
171. Testaz, S., Delannet, M. et Duband, J. (1999) "Adhesion and migration of avian neural crest cells on fibronectin require the cooperating activities of multiple integrins of the (beta)1 and (beta)3 families", *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4715-4728.
172. Sengbusch, J. K., He, W., Pinco, K. A. et Yang, J. T. (2002) "Dual functions of [alpha]4[beta]1 integrin in epicardial development: initial migration and long-term attachment", *J Cell Biol* 157: 873-882.
173. Qian, F., Vaux, D. L. et Weissman, I. L. (1994) "Expression of the integrin alpha 4 beta 1 on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation", *Cell* 77: 335-347.
174. Larouche, N., Larouche, K., Beliveau, A., LeClerc, S., Salesse, C., et al. (1998) "Transcriptional regulation of the alpha 4 integrin subunit gene in the metastatic spread of uveal melanoma", *Anticancer Research* 18: 3539-3547.

175. Garofalo, A., Chirivi, R. G., Foglieni, C., Pigott, R., Mortarini, R., et al. (1995) "Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases", *Cancer Res* 55: 414-419.
176. Matsuura, N., Puzon-McLaughlin, W., Irie, A., Morikawa, Y., Kakudo, K., et al. (1996) "Induction of experimental bone metastasis in mice by transfection of integrin alpha 4 beta 1 into tumor cells", *Am J Pathol* 148: 55-61.
177. Saini, A., Seller, Z., Davies, D., Marshall, J. F. et Hart, I. R. (1997) "Activation status and function of the VLA-4 (alpha4beta1) integrin expressed on human melanoma cell lines", *Int J Cancer* 73: 264-270.
178. Sherry, D. M. et Proske, P. A. (2001) "Localization of alpha integrin subunits in the neural retina of the tiger salamander", *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239: 278-287.
179. Rosen, G. D., Birkenmeier, T. M. et Dean, D. C. (1991) "Characterization of the alpha 4 integrin gene promoter", *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4094-4098.
180. Rosen, G. D., Barks, J. L., Iademarco, M. F., Fisher, R. J. et Dean, D. C. (1994) "An intricate arrangement of binding sites for the Ets family of transcription factors regulates activity of the alpha 4 integrin gene promoter", *J Biol Chem* 269: 15652-15660.
181. Audet, J. F., Masson, J. Y., Rosen, G. D., Salesse, C. et Guerin, S. L. (1994) "Multiple regulatory elements control the basal promoter activity of the human alpha 4 integrin gene", *DNA Cell Biol* 13: 1071-1085.

182. Postigo, A. A., Sheppard, A. M., Mucenski, M. L. et Dean, D. C. (1997) "c-Myb and Ets proteins synergize to overcome transcriptional repression by ZEB", *Embo J* 16: 3924-3934.
183. Postigo, A. A. et Dean, D. C. (1997) "ZEB, a vertebrate homolog of *Drosophila* Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation", *Embo J* 16: 3935-3943.
184. Larouche, K., Leclerc, S., Giasson, M. et Guerin, S. L. (1996) "Multiple nuclear regulatory proteins bind a single cis-acting promoter element to control basal transcription of the human alpha 4 integrin gene in corneal epithelial cells", *DNA Cell Biol* 15: 779-792.
185. Pytela, R., Pierschbacher, M. D. et Ruoslahti, E. (1985) "Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor", *Cell* 40: 191-198.
186. Aota, S., Nagai, T. et Yamada, K. M. (1991) "Characterization of regions of fibronectin besides the arginine-glycine-aspartic acid sequence required for adhesive function of the cell-binding domain using site-directed mutagenesis", *J Biol Chem* 266: 15938-15943.
187. Aota, S., Nomizu, M. et Yamada, K. M. (1994) "The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function", *J Biol Chem* 269: 24756-24761.
188. Akiyama, S. K. et Yamada, K. M. (1987) "Biosynthesis and acquisition of biological activity of the fibronectin receptor", *J Biol Chem* 262: 17536-17542.
189. Dalton, S. L., Marcantonio, E. E. et Assoian, R. K. (1992) "Cell attachment controls fibronectin and alpha 5 beta 1 integrin levels in

fibroblasts. Implications for anchorage-dependent and -independent growth", *J Biol Chem* 267: 8186-8191.

190. Hakkinen, L., Heino, J., Koivisto, L. et Larjava, H. (1994) "Altered interaction of human granulation-tissue fibroblasts with fibronectin is regulated by alpha 5 beta 1 integrin", *Biochim Biophys Acta* 1224: 33-42.
191. Klein, S., Bikfalvi, A., Birkenmeier, T. M., Giancotti, F. G. et Rifkin, D. B. (1996) "Integrin regulation by endogenous expression of 18-kDa fibroblast growth factor-2", *J Biol Chem* 271: 22583-22590.
192. Davey, G., Buzzai, M. et Assoian, R. K. (1999) "Reduced expression of (alpha)5(beta)1 integrin prevents spreading-dependent cell proliferation", *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4663-4672.
193. Nicholson, L. J. et Watt, F. M. (1991) "Decreased expression of fibronectin and the alpha 5 beta 1 integrin during terminal differentiation of human keratinocytes", *J Cell Sci* 98: 225-232.
194. Hotchin, N. A. et Watt, F. M. (1992) "Transcriptional and post-translational regulation of beta 1 integrin expression during keratinocyte terminal differentiation", *J Biol Chem* 267: 14852-14858.
195. Boles, B. K., Ritzenthaler, J., Birkenmeier, T. et Roman, J. (2000) "Phorbol ester-induced U-937 differentiation: effects on integrin alpha(5) gene transcription", *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L703-712.
196. Yin, Z., Gabriele, E., Leprini, A., Perris, R. et Colombatti, A. (1997) "Differential cation regulation of the alpha 5 beta 1 integrin-mediated adhesion of leukemic cells to the central cell-binding domain of fibronectin", *Cell Growth Differ* 8: 1339-1347.

197. Birkenmeier, T. M., McQuillan, J. J., Boedeker, E. D., Argraves, W. S., Ruoslahti, E., et al. (1991) "The alpha 5 beta 1 fibronectin receptor. Characterization of the alpha 5 gene promoter", *J Biol Chem* 266: 20544-20549.
198. Lefcort, F., Venstrom, K., McDonald, J. A. et Reichardt, L. F. (1992) "Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve", *Development* 116: 767-782.
199. Wang, D., Birkenmeier, T. M., Yang, J., Venkateswarlu, S., Humphrey, L., et al. (1995) "Release from quiescence stimulates the expression of integrin alpha 5 beta 1 which regulates DNA synthesis in human fibrosarcoma HT1080 cells", *J Cell Physiol* 164: 499-508.
200. Mortarini, R., Gismondi, A., Santoni, A., Parmiani, G. et Anichini, A. (1992) "Role of the alpha 5 beta 1 integrin receptor in the proliferative response of quiescent human melanoma cells to fibronectin", *Cancer Res* 52: 4499-4506.
201. Beliveau, A., Berube, M., Rousseau, A., Pelletier, G. et Guerin, S. L. (2000) "Expression of integrin alpha5beta1 and MMPs associated with epithelioid morphology and malignancy of uveal melanoma", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2363-2372.
202. Nadanaka, S., Sato, C., Kitajima, K., Katagiri, K., Irie, S., et al. (2001) "Occurrence of oligosialic acids on integrin alpha 5 subunit and their involvement in cell adhesion to fibronectin", *J Biol Chem* 276: 33657-33664.
203. Wang, D., Zhou, G. H., Birkenmeier, T. M., Gong, J., Sun, L., et al. (1995) "Autocrine transforming growth factor beta 1 modulates the

expression of integrin alpha 5 beta 1 in human colon carcinoma FET cells", J Biol Chem 270: 14154-14159.

204. Miyata, S., Koshikawa, N., Yasumitsu, H. et Miyazaki, K. (2000) "Trypsin stimulates integrin alpha(5)beta(1)-dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of proteinase-activated receptor-2", J Biol Chem 275: 4592-4598.
205. Sastry, S. K., Lakonishok, M., Thomas, D. A., Muschler, J. et Horwitz, A. F. (1996) "Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation", J Cell Biol 133: 169-184.
206. Frisch, S. M. et Francis, H. (1994) "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis", J Cell Biol 124: 619-626.
207. Grossmann, J. (2002) "Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis—Anoikis"", Apoptosis 7: 247-260.
208. Fukai, F., Mashimo, M., Akiyama, K., Goto, T., Tanuma, S., et al. (1998) "Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide", Exp Cell Res 242: 92-99.
209. Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J. C. et Ruoslahti, E. (1995) "The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression", Proc Natl Acad Sci U S A 92: 6161-6165.
210. Lee, J. W. et Juliano, R. L. (2000) "alpha5beta1 integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway", Mol Biol Cell 11: 1973-1987.

211. O'Brien, V., Frisch, S. M. et Juliano, R. L. (1996) "Expression of the integrin alpha 5 subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation", *Exp Cell Res* 224: 208-213.
212. Rizzolo, L. J., Zhou, S. et Li, Z. Q. (1994) "The neural retina maintains integrins in the apical membrane of the RPE early in development", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2567-2576.
213. Anderson, D. H., Johnson, L. V. et Hageman, G. S. (1995) "Vitronectin receptor expression and distribution at the photoreceptor- retinal pigment epithelial interface", *J Comp Neurol* 360: 1-16.
214. Anderson, D. H., Guerin, C. J., Matsumoto, B. et Pfeffer, B. A. (1990) "Identification and localization of a beta-1 receptor from the integrin family in mammalian retinal pigment epithelial cells", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 81-93.
215. Jin, M., He, S., Worpel, V., Ryan, S. J. et Hinton, D. R. (2000) "Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 4324-4332.
216. Kim, K. S., Tezel, T. H. et Del Priore, L. V. (1998) "The reattachment of adult human retinal pigment epithelium (RPE) to extracellular matrix (ECM) is mediated mainly by beta1 integrin subunit", *Invest Ophthalmol Vis Sc* 39: S98.
217. Meitinger, D., Hunt, D. M., Shih, D. T., Fox, J. C. et Hunt, R. C. (2001) "Vitreous-induced modulation of integrins in retinal pigment epithelial cells: effects of fibroblast growth factor-2", *Exp Eye Res* 73: 681-692.
218. Mousa, S. A., Lorelli, W. et Campochiaro, P. A. (1999) "Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic

growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells", *J Cell Biochem* 74: 135-143.

219. Yang, C. H., Huang, T. F., Liu, K. R., Chen, M. S. et Hung, P. T. (1996) "Inhibition of retinal pigment epithelial cell-induced tractional retinal detachment by disintegrins, a group of Arg-Gly-Asp-containing peptides from viper venom", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 843-854.
220. Zhao, M. W., Jin, M. L., He, S., Spee, C., Ryan, S. J., et al. (1999) "A distinct integrin-mediated phagocytic pathway for extracellular matrix remodeling by RPE cells", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 2713-2723.
221. Corbi, A. L., Jensen, U. B. et Watt, F. M. (2000) "The alpha2 and alpha5 integrin genes: identification of transcription factors that regulate promoter activity in epidermal keratinocytes", *FEBS Lett* 474: 201-207.
222. Gingras, M. E., Larouche, K., Larouche, N., Leclerc, S., Salesse, C., et al. (2003) "Regulation of the Integrin Subunit alpha5 Gene Promoter by the Transcription Factors Sp1/Sp3 Is Influenced by the Cell Density in Rabbit Corneal Epithelial Cells", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 3742-3755.
223. Dunn, K. C., Aotaki-Keen, A. E., Putkey, F. R. et Hjelmeland, L. M. (1996) "ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties", *Exp Eye Res* 62: 155-169.
224. Li, W., Yanoff, M., Li, Y. et He, Z. (1999) "Artificial senescence of bovine retinal pigment epithelial cells induced by near-ultraviolet in vitro", *Mech Ageing Dev* 110: 137-155.

225. Rawes, V., Kipling, D., Kill, I. R. et Faragher, R. G. (1997) "The kinetics of senescence in retinal pigmented epithelial cells: a test for the telomere hypothesis of ageing?" *Biochemistry (Mosc)* 62: 1291-1295.
226. Del Priore, L. V., Kuo, Y. H. et Tezel, T. H. (2002) "Age-related changes in human RPE cell density and apoptosis proportion in situ", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 3312-3318.
227. Honda, S., Weigel, A., Hjelmeland, L. M. et Handa, J. T. (2001) "Induction of telomere shortening and replicative senescence by cryopreservation", *Biochem Biophys Res Commun* 282: 493-498.
228. Matsunaga, H., Handa, J. T., Gelfman, C. M. et Hjelmeland, L. M. (1999) "The mRNA phenotype of a human RPE cell line at replicative senescence", *Mol Vis* 5: 39.
229. Valtink, M., Engelmann, K., Strauss, O., Kruger, R., Loliger, C., et al. (1999) "Physiological features of primary cultures and subcultures of human retinal pigment epithelial cells before and after cryopreservation for cell transplantation", *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237: 1001-1006.
230. Ham, R. G. et McKeehan, W. L. (1979) "Media and growth requirements" *In Methods in enzymology*, éditeur(s), Academic Press, New York, pp. 43-93.
231. "Guide to cell proliferation and apoptosis methods". Site web: http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/cell_man/cell_toc.html (novembre 2003)

- 232. Beliveau, A., Leclerc, S., Rouleau, M. et Guerin, S. L. (1999) "Multiple cloning sites from mammalian expression vectors interfere with gene promoter studies in vitro", *Eur J Biochem* 261: 585-590.
- 233. Lamph, W. W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. et Verma, I. M. (1988) "Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA", *Nature* 334: 629-631.
- 234. Ryder, K. et Nathans, D. (1988) "Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors", *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8464-8467.
- 235. Quantin, B. et Breathnach, R. (1988) "Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts", *Nature* 334: 538-539.
- 236. Wu, B. Y., Fodor, E. J., Edwards, R. H. et Rutter, W. J. (1989) "Nerve growth factor induces the proto-oncogene c-jun in PC12 cells", *J Biol Chem* 264: 9000-9003.
- 237. Majerus, M. A., Bibollet-Ruche, F., Telliez, J. B., Wasylyk, B. et Bailleul, B. (1992) "Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter", *Nucleic Acids Res* 20: 2699-2703.
- 238. Proulx, S., Gingras, M. E., Rufiange, A., Guérin, S. L. et Salesse, C. (2003) "Expression of the alpha5 integrin subunit gene promoter is altered by the vitreous in the retinal pigment epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sc* 43: ARVO E-Abstract 2279.
- 239. Vidaurri-Leal, J., Hohman, R. et Glaser, B. M. (1984) "Effect of vitreous on morphologic characteristics of retinal pigment epithelial cells. A new approach to the study of proliferative vitreoretinopathy", *Arch Ophthalmol* 102: 1220-1223.

- 240. Kirchhof, B., Kirchhof, E., Ryan, S. J. et Sorgente, N. (1988) "Human retinal pigment epithelial cell cultures: phenotypic modulation by vitreous and macrophages", *Exp Eye Res* 47: 457-463.
- 241. Kirchhof, B., Kirchhof, E., Ryan, S. J. et Sorgente, N. (1989) "Vitreous modulation of migration and proliferation of retinal pigment epithelial cells in vitro", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1951-1957.
- 242. Meitinger, D., Hunt, D. M., Shih Dt, D. T., Fox, J. C. et Hunt, R. C. (2001) "Vitreous-induced Modulation of Integrins in Retinal Pigment Epithelial Cells: Effects of Fibroblast Growth Factor-2", *Exp Eye Res* 73: 681-692.
- 243. Huhtala, P., Humphries, M. J., McCarthy, J. B., Tremble, P. M., Werb, Z., et al. (1995) "Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin", *J Cell Biol* 129: 867-879.
- 244. Pinco, K. A., He, W. et Yang, J. T. (2002) "alpha 4,beta 1 integrin regulates Lamellipodia protrusion via a focal complex/focal adhesion-independent mechanism", *Molecular Biology of the Cell* 13: 3203-3217.